

HENRIQUE JORGE STAHLKE JÚNIOR

**HOMOCISTEINEMIA PLASMÁTICA ELEVADA CAUSANDO
ATEROGÊNESE NA AORTA DE COELHOS. MODELO
EXPERIMENTAL**

Tese apresentada no Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do grau acadêmico de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Domingues Repka

Coordenador: Prof. Dr. Antônio Carlos L. Campos

CURITIBA

2002

Stahlke Júnior, Henrique Jorge

HOMOCISTEÍNA PLASMÁTICA ELEVADA CAUSANDO ATEROGÊNESE NA
AORTA DE COELHOS. MODELO EXPERIMENTAL – Curitiba, 2002.
f. 72. il.

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Domingues Repka.
Tese (Doutorado)/Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal
do Paraná.

1. Homocisteína plasmática; 2. Aterogênese; 3. Aorta de coelhos
4. Modelo experimental

I. Título

Dedico este estudo a minha esposa Marize, companheira de todas as horas.

Aos queridos
Paulo Henrique
Paulo Sérgio
Luciana

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Iseu de Santos Elias Affonso da Costa, por me ensinar, conduzir e orientar na minha carreira cirúrgica.

Ao Professor Doutor João Carlos Domingues Repka, pela valioso auxílio, orientações e infindável espírito acadêmico.

Ao Professor Doutor Antônio Carlos Ligocki Campos, Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da Universidade Federal do Paraná, exemplo de seriedade e determinação, meu reconhecimento pela condução exemplar do curso e pelos valiosos ensinamentos dispensados a nós, sempre que solicitado.

Ao Professor Doutor Osvaldo Malafaia, minha sincera gratidão pelo apoio sincero, amizade e oportunidade da realização do doutorado nesta renomada instituição.

Ao Professor Doutor Danton Richlin da Rocha Loures, pela amizade nestes anos de convívio na disciplina de cirurgia cardíovascular.

Ao Professor Doutor Sérgio Brenner, pela amizade sincera.

Ao Professor Doutor Luiz Fernando Bleggi Torres, pela oportunidade de realizar o estudo anatomopatológico no Serviço de Anatomia patológica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná.

Ao Doutor Joel Takashi Totsugui, pela realização do estudo anatomopatológico.

À Doutora Leonora Zozula Blind Pope pelas fotomicrografias.

Ao Professor Doutor João Batista Marchesini, pelo incentivo na confecção deste trabalho.

Ao Professor Doutor Elias Abrão, que tão cedo nos deixou.

Ao Professor Virgílio Josué Balestro, pelo trabalho esmerado na correção gramatical e ortográfica desta tese.

À Bióloga Márcia Olandoski Erbano, pelo valioso auxílio na análise dos resultados estatísticos.

Ao Doutor Emílio Granato, do laboratório Frischmann-Aisengart, pela realização das dosagens bioquímicas.

Ao farmacêutico Vagner Mariani, pelo auxílio neste trabalho.

Ao médico veterinário Enio Heller, pela obtenção, cuidado e esmero com os animais usados neste trabalho.

Ao bioterista Elson Dias de França, do Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da Universidade Federal do Paraná, pela sua dedicação.

À Edlaine Araújo dos Santos, secretária do Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da Universidade Federal do Paraná, pelo auxílio na confecção deste trabalho.

SUMÁRIO

	LISTA DE FIGURAS.....	vii
	LISTA DE TABELAS.....	viii
	LISTA DE GRÁFICOS.....	ix
	LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
	RESUMO.....	xii
	ABSTRACT.....	xiii
1	INTRODUÇÃO.....	2
1.1	OBJETIVO.....	3
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	5
2.1	METABOLISMO DA HOMOCISTEÍNA.....	7
2.2	HOMOCISTEÍNA, SUA RELAÇÃO COM ENZIMAS, E VITAMINA B	10
2.3	AÇÃO DA HOMOCISTEÍNA SOBRE O ENDOTÉLIO.....	11
2.4	AÇÃO DA HOMOCISTEÍNA NOS FATORES DE COAGULAÇÃO....	14
2.5	HOMOCISTEÍNA E DOENÇA VASCULAR.....	15
3	MATERIAL E MÉTODO.....	19
3.1	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	19
3.2	DESCRIÇÃO DO PROTOCOLO.....	19
3.3	DOSAGENS SANGÜÍNEAS.....	20

3.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	20
3.5	ESTUDO ANATOMOPATOLÓGICO.....	20
3.5.1	Preparo Técnico.....	21
3.6	AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA.....	21
4	RESULTADOS	23
4.1	PESO DOS ANIMAIS.....	23
4.2	DOSAGENS BIOQUÍMICAS.....	23
4.2.1	Níveis Séricos de Lipoproteínas de Alta Densidade (HDL) e de Baixa Densidade (LDL)	23
4.2.2	Dosagens de Colesterol Total.....	26
4.2.3	Dosagens de Triglicerídeos.....	27
4.2.4	Níveis de Homocisteína ($\mu\text{mol/l}$)	29
4.3	RESULTADOS DO EXAME ANATOMOPATOLÓGICO.....	30
4.3.1	Resultado Macroscópico.....	30
4.4	RESULTADOS DO EXAME MICROSCÓPICO.....	30
5	DISCUSSÃO	39
5.1	HOMOCISTEÍNA E LIPOPROTEÍNA DE BAIXA DENSIDADE (LDL)	41
6	CONCLUSÃO	50
	REFERÊNCIAS	52
	ANEXO 1 - COMPOSIÇÃO DA RAÇÃO PARA ROEDORES	68
	ANEXO 2 - DOSAGENS BIOQUÍMICAS	69

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	CICLO DA METIONINA. VIAS METABÓLICAS DO METABOLISMO DA HOMOCISTEÍNA.....	8
FIGURA 2	HOMOCISTEÍNA TOTAL. HOMOCISTEÍNA LIGADA À PROTEÍNA. HOMOCISTEÍNA SOLÚVEL EM ÁCIDO.....	8
FIGURA 3	FOTOMICROGRAFIA DA AORTA DO COELHO DO GRUPO C. COLORAÇÃO HEMATOXILINA-EOSINA. AUMENTO DE 40 VEZES.....	31
FIGURA 4	FOTOMICROGRAFIA DA AORTA DO COELHO DO GRUPO C. COLORAÇÃO PARA FIBRAS ELÁSTICAS PELA TÉCNICA DE WEIGERT. AUMENTO DE 40 VEZES.....	32
FIGURA 5	FOTOMICROGRAFIA DA AORTA DO COELHO DO GRUPO C. COLORAÇÃO PELO TRICÔMIO DE MALLORI. AUMENTO DE 40 VEZES.....	32
FIGURA 6	FOTOMICROGRAFIA DA AORTA DO COELHO DO GRUPO C. COLORAÇÃO HEMATOXILINA-EOSINA. AUMENTO DE 200 VEZES.....	33
FIGURA 7	FOTOMICROGRAFIA DA AORTA DO COELHO DO GRUPO M. COLORAÇÃO HEMATOXILINA-EOSINA. AUMENTO DE 200 VEZES.....	34
FIGURA 8	FOTOMICROGRAFIA DA AORTA DO COELHO DO GRUPO M. COLORAÇÃO PELA TÉCNICA DE WEIGERT. AUMENTO DE 200 VEZES.....	35
FIGURA 9	FOTOMICROGRAFIA DA AORTA DO COELHO DO GRUPO M. COLORAÇÃO PELA TÉCNICA DE WEIGERT. AUMENTO DE 4 VEZES.....	36
FIGURA 10	FOTOMICROGRAFIA DA AORTA DO COELHO DO GRUPO M. COLORAÇÃO PELO TRICÔMIO DE MALLORI. AUMENTO DE 40 VEZES.....	37

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	PESO DOS ANIMAIS EM GRAMAS DURANTE O EXPERIMENTO.....	23
TABELA 2	NÍVEIS DE HDL (mg/dl).....	24
TABELA 3	NÍVEIS DE LDL (mg/dl).....	25
TABELA 4	COLESTEROL SÉRICO (mg/dl).....	26
TABELA 5	TRIGLICERÍDEOS (mg/dl) SÉRICO DOS ANIMAIS.....	28
TABELA 6	NÍVEIS SÉRICOS DA HOMOCISTEÍNA ($\mu\text{mol/l}$).....	29

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1	HDL (mg/dl) MÉDIO DO GRUPO C e DO GRUPO M.....	24
GRÁFICO 2	NÍVEIS MÉDIOS DO LDL DO GRUPO C e M.....	25
GRÁFICO 3	COLESTEROL MÉDIO (mg/dl) NO GRUPO C e M.....	27
GRÁFICO 4	TRIGLICERÍDEOS (mg/dl) MÉDIO DO GRUPO C e GRUPO M.....	28
GRÁFICO 5	PROGRESSÃO DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DA HOMOCISTEÍNA DO DIA 0 AO 60º DIA NOS GRUPOS.....	30

LISTA DE ABREVIATURAS

Adv.	adventícia
µm	micrômetro
µmol/l	micromol por litro
C	controle
CE	células espumosas
CM	camada muscular
CML	células musculares lisas
CtAct	glicosaminaglicanas
E	endotélio
H ²	homocisteína
HciT	Homocisteína tiolactona
HDL	lipoproteína de alta densidade
HE	hematoxilina - eosina
HPLC	cromatografia líquida de alta performance
LDL	lipoproteína de baixa densidade
LEE	limitante elástica externa
LEI	limitante elástica interna
Lpa	lipoproteína (a)
M	metionina
mg/dl	miligrama por decilitro
ml	mililitro
MTHF	metiltetrahidrofolato
N	núcleo
NADPH	nicotinamida – adenina – dinucleotídeo fosfato
NADPT+	nicotinamida – adenina – dinucleotídeo fosfato reduzida
PAPS	fosfoadenosina fosfosulfato
PL	placa aterogênica
SAH	S. adenosil homocisteína

SAM	S. adenosil metionina
Vit. B12	cobalamina
Vit. B6	piridoxal fosfato

RESUMO

HOMOCISTEINEMIA PLASMÁTICA ELEVADA CAUSANDO ATEROGÊNESE NA AORTA DE COELHOS. MODELO EXPERIMENTAL

Este estudo tem o objetivo de avaliar os efeitos da homocisteinemia plasmática elevada na formação da placa aterosclerótica na aorta de coelhos. Para tanto, realizou-se estudo experimental comparativo em dois grupos homogêneos de coelhos, durante 60 dias. Foram utilizados 20 coelhos da linhagem New Zealand divididos em dois grupos de dez animais, a saber: grupo controle (C), grupo metionina (M). Todos os animais receberam a mesma dieta sólida e cada um recebia 500ml de água. Na água fornecida aos coelhos do grupo M foi acrescentada 2ml de uma solução de metionina na concentração de 200mg/ml, renovada a cada 24 horas. Foram colhidas amostras de sangue para dosagem de colesterol, triglicerídios, HDL, LDL e homocisteína nos 0,30° e 60° dias. Os animais foram submetidos à eutanásia no 60° dia, por dose letal de anestésico. Foram retirados a aorta torácica e a aorta abdominal para estudo anatomopatológico.

Os resultados não mostraram alterações significativas nos níveis de colesterol total, triglicerídio, da HDL e da LDL nos dois grupos, no grupo C não houve alteração entre o 0,30° e 60° dia permanecendo neste grupo a homocisteína plasmática partindo de um valor médio de 3,35 $\mu\text{mol/l}$ no 0 dia para alcançar 11,10 $\mu\text{mol/l}$ como valor médio no 30° dia, e atingir 16,19 $\mu\text{mol/l}$ como valor médio no 60° dia ($p < 0,0001$). O exame microscópico das aortas dos coelhos do grupo C foram semelhantes sem alterações patológicas na íntima, muscular ou adventícia. No exame microscópico das aortas do grupo M, os achados foram semelhantes em todas as preparações examinadas deste grupo. Encontraram-se túnica íntima hiperplasiada com endotélio preservado e presença de depósitos subendoteliais. As placas são formadas por macrófagos espumosos, não foram observadas células musculares lisas, cristais de colesterol ou células inflamatórias. Túnica média com lâmina elástica interna íntegra. Concluiu-se que a homocisteinemia plasmática elevada causa aterogênese na aorta de coelhos.

Palavras-chaves: 1. Homocisteína plasmática; 2. Aterogênese; 3. Aorta de coelhos; 4. Modelo experimental.

ABSTRACT

HIGH PLASMA LEVELS OF HOMOCYSTEINE CAUSE ATHEROGENESIS IN THE RABBIT AORTA. EXPERIMENTAL MODEL

The present study has the objective of evaluating the effects of high levels of plasma homocysteine in atherosclerotic plaque formation in the rabbit aorta. An experimental study was set up, comparing two homogeneous groups of rabbits for 60 days. Twenty New Zealand rabbits were divided into two groups of ten animals each: the methionine (M) and the control group (C). All animals received the same diet and 500 ml of water daily. A solution of methionin (concentration = 200 mg/ml) was added to the water received by the M group of rabbits. Blood samples were collected for the determination of cholesterol, tryglicerides, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol and homocysteine levels at day 0, day 30 and day 60. The animals were killed by lethal injections of anesthetic at day 60. The thoracic and abdominal aorta were excised and submitted for anatomo-pathologic analysis. No significant differences were observed between the two groups in cholesterol, tryglicerides, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol levels. In the C group, average plasma levels of homocysteine remained stable at 3.70 μ mol/ml from day 0 through day 60. In the M group, average plasma levels of homocystein rose from 3.35 μ mol/ml at day 0 to 11.1 μ mol/ml at day 30 and further to 16.19 μ mol/ml at day 60 ($p < 0,001$). Microscopic examination of the aorta showed no pathologic alterations in C group animals. In group M animals, microscopic examination showed intimal hyperplasia and subendothelial deposits of foam-cell macrophages and connective tissue. Smooth muscle cells, cholesterol crystals and inflammatory cells were not observed. These findings are suggestive of atherosclerotic plaque formation, in its early stages. It is concluded that high levels of plasma homocysteine cause atherogenesis in the rabbit aorta.

Key-words: 1. Plasmatic homocysteinemia; 2. Atherogenesis; 3. Rabbits aorta; 4. Experimental model.

1 INTRODUÇÃO

A compreensão do conceito de fator de risco é fundamental para possibilitar a prevenção de determinada doença. O entendimento de que fator de risco guarda relação de associação com a doença em estudo e não necessariamente relação de causa, é fundamental para a avaliação dos fatores de risco tradicionais e, mais recentemente, dos novos fatores de risco. Com base nesse conceito, observa-se que a presença de um fator de risco implica maior possibilidade de desenvolver determinada doença. A ausência desse fator, porém, não exclui tal possibilidade (GEBARA et al., 1977).

Dentre os fatores de risco mais tradicionais para a arterioesclerose, destacam-se hipertensão arterial, diabetes melito, obesidade, sedentarismo, história familiar de coronariopatia, sexo masculino, tabagismo e hipercolesterolemia (LEVY e KANNEL, 1988). Contudo, grande parte dos pacientes que desenvolveram doença clínica não apresentam nenhuma dessas condições (FUSTER e PEARSON, 1996). Nos últimos anos, foram identificados outros marcadores, tais como as apolipoproteínas AI, AII, B, E e LP (a), fibrinogênio e, mais recentemente, a homocisteína, os quais podem expandir o entendimento sobre os mecanismos fisiopatológicos da arteriosclerose, e possibilitar o desenvolvimento de novas medidas preventivas ou terapêuticas.

Há trinta e dois anos, Mc CULLY (1969) relatou o fato de que crianças com homocistinúria faleciam em decorrência do erro inato do metabolismo da cobalamina e da deficiência da enzima cistationina- β -sintetase. Essas crianças apresentavam severa aterosclerose e a única anormalidade metabólica comum era a concentração elevada de homocisteína no plasma. Mc Cully admitiu que a hiper-homocisteinemia seria responsável pela doença arterioesclerótica. Ao longo do século XX, o controle das doenças infectocontagiosas e a melhora das condições de vida praticamente duplicaram a expectativa de vida dos indivíduos nos países desenvolvidos. Este aumento da longevidade humana fez com que as doenças degenerativas do sistema circulatório figurassem como o maior problema da saúde pública no final do século passado e início deste.

A doença arterioesclerótica é a principal causa de morte nos países ocidentais. A Organização Mundial de Saúde prevê que as doenças circulatórias vão tornar-se o principal problema de saúde neste século (WORLD HEALTH ORGANIZATION ANNUAL REPORT, 1998). Nos Estados Unidos, cada ano, aproximadamente 5,4 milhões de pessoas são diagnosticadas com coronariopatias e mais de 550.000 mortes são atribuídas à aterosclerose coronária (ROOS, 1977). No Brasil, as doenças cardiovasculares também ocupam o primeiro lugar entre as causas de morte, vitimando aproximadamente 300.000 brasileiros por ano. As três primeiras capitais que apresentam maiores coeficientes de mortalidade por doença isquêmica são, em ordem decrescente, Porto Alegre, Rio de Janeiro e Curitiba (LOTUFO, 1996). O estudo inicial de WILCKEN e WILCKEN em 1976, confirmou que a homocisteína plasmática elevada era fator de risco independente para a doença arterioesclerótica. Esta relação também foi confirmada em pacientes com doença carotídea, coronariana e das artérias dos membros inferiores por NEHLER e TAYLOR em 1997.

Os estudos de STAMPFER (1992), que acompanhou 14.916 médicos pelo período de 5 anos, concluíram que o risco de infarto do miocárdio foi 3,1 vezes maior nos médicos que apresentaram homocisteína 5% mais elevada. Os estudos de TAYLOR em 1991 e 1999 demonstraram a grande incidência de homocisteína plasmática elevada em pacientes com doença arterial periférica, quando comparada com grupo controle assintomático. Os mesmos estudos evidenciaram a progressão da doença arterial periférica em pacientes com hiper-homocisteinemia numa avaliação prospectiva, com seguimento dos pacientes por três anos.

1.1 OBJETIVO

O objetivo deste estudo é avaliar os efeitos aterogênicos da homocisteína plasmática elevada na artéria aorta de coelhos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

A homocisteína é um aminoácido que contém enxofre em grupo de sulfidril livre. Foi descoberto em 1932 por Du Vigneaud como produto intermediário da demetilação da metionina (UELAND et al., 1992) e descrita pela primeira vez em 1939 (Du VIGNEAUD et al., 1950). O interesse pela homocisteína aumentou quando foi descoberto o erro inato do metabolismo, a homocistinúria. Significa a excreção de grande quantidade de homocisteína, ou dissulfeto de homocisteína, na urina, reflexo dos altos níveis de homocisteína no sangue. Esta doença foi descrita pela primeira vez em 1962 por Carson e Neill, que a identificaram em dois irmãos, com quatro e seis anos de idade, entre 2.081 indivíduos com retardo mental. No mesmo ano GERRITSEN et al. (1962) e dois anos após GERRITSEN e WAISMAN (1964) identificaram homocisteína na urina e documentaram a ausência de cistationina cerebral em uma criança com retardo mental e tromboembolismo. Foi demonstrado por MUDD et al. (1964) a ausência da atividade da cistationina- β -sintetase no fígado de uma criança com homocistinúria. Em seguida (GIBSON et al., 1964; SCHIMKE et al., 1965 e WHITE et al., 1965) relataram pacientes com deficiência da cistationina- β -sintetase suscetíveis à doença vascular severa.

Em 1969, Mc CULLY descreveu lesões vasculares similares às observadas na deficiência da cistationina- β -sintetase, em uma criança que foi a óbito de homocistinúria com sete semanas e meia de vida, causada por um defeito no metabolismo da cobalamina. Alterações vasculares semelhantes foram relatadas por KANWAR et al. (1976) em uma menina de dez anos de idade que foi a óbito de homocistinúria causada por deficiência na enzima 5, 10 – metileno-tetra hidrofolato – redutase. Estes e outros relatos subseqüentes demonstraram a diversidade clínica e bioquímica dos pacientes com homocistinúria.

A forma mais comum é a deficiência da cistationina- β -sintetase; raros casos são devidos a defeitos no metabolismo da cobalamina e deficiência da 5, 10 – metilenotetrahidrofolato – redutase (MUDD et al., 1972; MUDD et al., 1989 e

FOWLER, 1997). O desenvolvimento de doença vascular precoce em diferentes formas de homocistinúria foi confirmado pelo relato de vários outros casos (MUDD et al., 1989; UELAND et al., 1992).

Em 1969, Mc CULLY descreveu lesões ateroscleróticas prematuras em pacientes portadores de homocistinúria, comprometendo artérias grandes, médias e pequenas, podendo afetar qualquer leito vascular. Relatou espessamento acentuado da íntima, bem como proliferação e desgaste da camada média de fibras musculares, com aumento do colágeno intersticial. Havia alterações na lâmina elástica interna, da camada muscular da parede arterial; as lesões estavam associadas com a proliferação do tecido conectivo perivascular, apresentando aumento no número de fibroblastos, feixes de colágeno e fibras elásticas.

Mc CULLY e WILSON, em 1975, formularam a teoria aterosclerótica da homocistinúria, baseada em evidências clínica e experimental. Evidenciaram as lesões vasculares desenvolvidas na homocistinúria, causada por diferentes defeitos metabólicos, sugerindo que altas concentrações de homocisteína, por si só, são responsáveis pelo dano vascular. A teoria também admite que moderada elevação da homocisteína no sangue, causada por anormalidade no metabolismo daquele aminoácido, poderia estar associada com risco aumentado para doença vascular (Mc CULLY, 1983).

Desde o trabalho pioneiro de WILCKEN & WILCKEN em 1976, que relaciona doença arterial coronariana com níveis mais elevados de homocisteína, tem sido mostrado que a aterosclerose prematura das artérias coronárias, cerebrais e periféricas, independentemente de outros fatores de risco, está associada com homocisteína elevada no plasma.

2.1 O METABOLISMO DA HOMOCISTEÍNA

A homocisteína é um produto intermediário da demetilação da metionina. Metionina é um aminoácido essencial fornecido pelo catabolismo diário de proteínas. Sua necessidade diária é de 10-40 mg/kg (UELAND et al., 1992). A metionina não incorporada à proteína endógena é demetilada e catalisada pela enzima metionina S – adenosiltransferase, resultando em S – adenosil - metionina (FINDELSTEIN & MARTIN, 1986; FINDELSTEIN, 1990; FOWLER, 1997). Figura 1. Somente uma pequena fração da S – adenosil - metionina é usada na síntese das poliaminas, e sua maior função é doar radicais metila, em várias reações de transmetilação .

O produto demetilado da S – adenosil - metionina é a S – adenosil - homocisteína, hidrolisado pela enzima S – adenosil – homocisteína – hidrolase, formando homocisteína e adenosina.

A homocisteína pode ser catabolisada para cisteína por meio de reações dependentes da vitamina B6, complementando assim a via de transulfuração ou remetilação da metionina. Na primeira destas reações, a homocisteína é condensada com a serina, pela enzima cistationina- β -sintetase, formando a cistationina. Esta reação sob condições fisiológicas é irreversível e explica a impossibilidade da cistationina servir como precursora da metionina. A cistationina é catalisada pela enzima γ – cistationinase, dependente da vitamina B6 em cisteína, que é finalmente convertida para sulfato e excretada na urina.

Na via de remetilação (FINDELSTEIN, 1990; FOWLER, 1997), a homocisteína é reciclada para metionina através de duas reações diferentes. A primeira necessita da presença da 5 – metiltetraidrofolato – homocisteínametil – transferase (metionina sintetase). A metilcobalamina (vitamina B12) e o metiltetraidrofolato são utilizados como co-fatores e co-substratos para esta enzima. A via de remetilação é facilitada durante a deficiência relativa da metionina; esta reciclagem e conservação da homocisteína asseguram a manutenção adequada de metionina.

FIGURA 1 – CICLO DA METIONINA: VIAS METABÓLICAS DO METABOLISMO DA HOMOCISTEÍNA

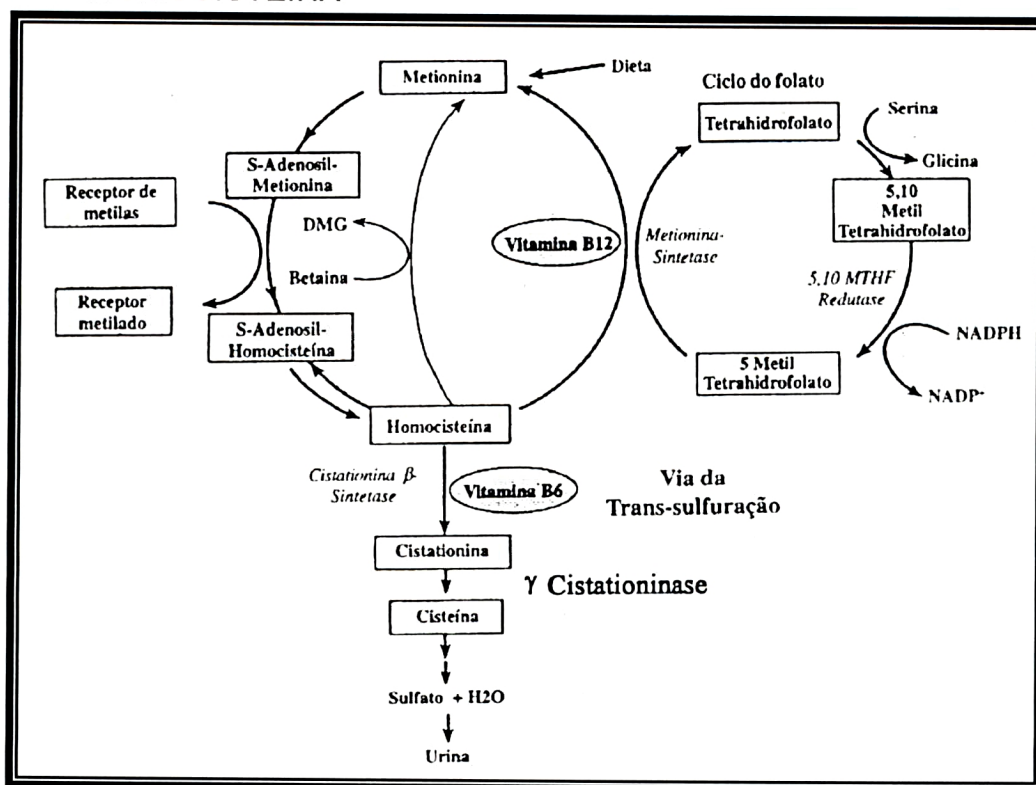
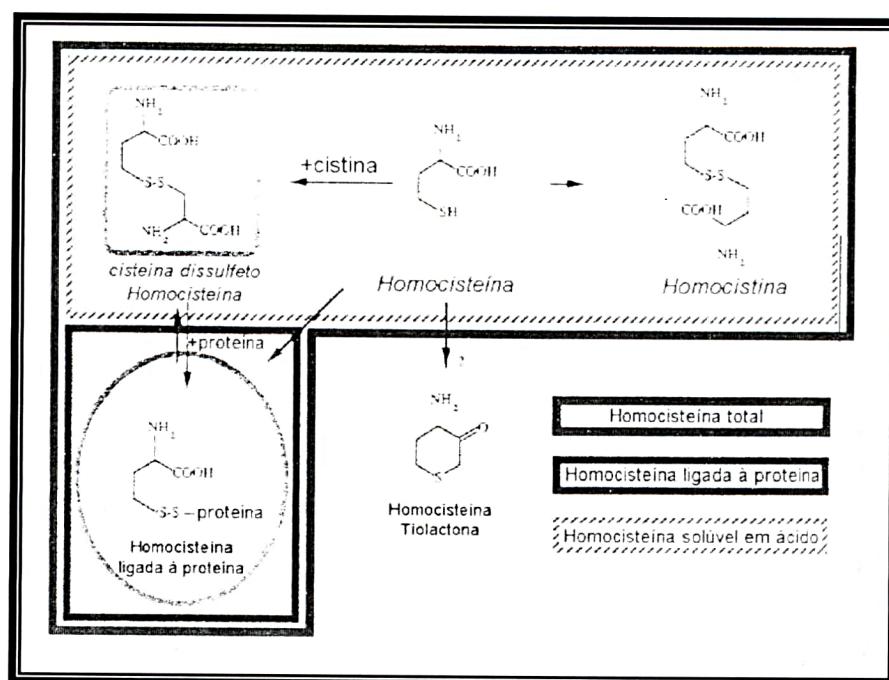


FIGURA 2 – HOMOCISTEÍNA TOTAL. HOMOCISTEÍNA LIGADA À PROTEÍNA. HOMOCISTEÍNA SOLÚVEL EM ÁCIDO



A segunda via consiste na remetilação da homocisteína catalisada pela enzima betaína-homocisteína-metiltransferase. A homocisteína é um indicador importante da situação do metabolismo da metionina, e sua seqüência metabólica pode ser influenciada por alterações de folato, vitamina B6, cobalamina ou pelas atividades das diversas enzimas que participam das vias de transulfurações ou remetilação. Normalmente, a concentração de homocisteína é mantida dentro de limites estreitos (UELAND et al., 1992), e qualquer aumento na produção origina-se principalmente a partir das células hepáticas (CHRISTENSEN et al., 1991; REFSUM et al., 1991). A concentração sangüínea da homocisteína é, dessa forma, reflexo expressivo da sua concentração intracelular e da integridade das diversas vias responsáveis pelo seu metabolismo. Aproximadamente 80% da homocisteína sangüínea une-se às proteínas por meio de ligação dissulfeto (MANSOOR et al., 1992). A homocisteína livre, cerca de 20%, combina-se por oxidação com a própria homocisteína para formar o dímero homocisteína (homocistina), ou com a cisteína para constituir a forma mista cisteína-dissulfeto-homocisteína. Somente pequena quantidade circula como homocisteína livre (UELAND & REFSUM, 1989; MANSOOR et al., 1992) (figura 2). Esta forma de homocisteína livre liga-se às proteínas, mesmo quando as amostras de sangue são imediatamente congeladas (REFSUM et al., 1985); portanto a homocisteína livre pode ser variável, porém a homocisteína total permanece constante. Ainda assim, se o sangue total for armazenado à temperatura ambiente, a homocisteína total pode aumentar, devido à saída da homocisteína dos eritrócitos (MALINOW et al., 1994). Alguns autores têm preferido o termo “hiper-homocist(e)inemia” para designar elevações da homocisteína, homocistina, cisteína, dissulfeto-homocisteína e homocisteína ligada à proteína (MALINOW et al., 1989; COULL et al., 1990); porém a maioria dos estudos publicados, continua usando o termo hiper-homocisteinemia para designar, de maneira mais simples, tais elevações (Mc CULLY, 1996).

Os valores da homocisteína total plasmática em jejum na população normal estão situados na faixa de 5 a 15 $\mu\text{mol/l}$ (UELAND et al., 1993; JACOBSEN et al., 1994). Alguns indivíduos podem ter concentrações normais em jejum e comprometimento do metabolismo da homocisteína. Nestas situações, utiliza-se o

teste de sobrecarga em metionina para evidenciar esta anormalidade latente (UELAND et al., 1992). Semelhante, em princípio, ao teste de tolerância à glicose, a sobrecarga é realizada pela administração de uma dose oral de metionina de 0,10 gr/kg de peso corporal. Desta forma, aumentam os níveis plasmáticos de homocisteína que podem ser medidos 2, 4, 6 ou 8 horas depois. Existe alguma variabilidade em relação ao tempo no qual se observam valores máximos: os níveis da homocisteína livre podem atingir o máximo entre 4 e 6 horas. Estudos recentes da homocisteína, em situações patológicas, têm utilizado as concentrações da homocisteína total em jejum (ISRAELSSON et al., 1988; GENEST JR. et al., 1991; UBBINK et al., 1991; BRATTSTRÖM et al., 1992), apresentando conclusões semelhantes àsquelas de estudos prévios, empregando o teste de sobrecarga de metionina (WILCKEN & WILCKEN, 1976; BOERS et al., 1985; CLARKE et al., 1991).

2.2 HOMOCISTEÍNA, SUA RELAÇÃO COM ENZIMAS, E VITAMINAS B

A homocisteína total plasmática elevada é reconhecida como fator de risco independente para a doença arterial coronariana, cerebrovascular e vascular periférica (BOUSHEY et al., 1995; BOERS, 1997; GERHARD et al., 1999; CHRISTEN et al., 2000). A hiper-homocisteinemia pode ocorrer como resultado de distúrbio genético ou nutricional no metabolismo da homocisteína. A homocisteína é metabolizada para cisteína pela cistationina- β -sintetase, que requer piridoxal fosfato (vitamina B6), como co-fator. Pacientes com severa deficiência da cistationina- β -sintetase têm níveis elevados de metionina no plasma em adição ao incremento da homocisteína. A heterozigose para a deficiência da cistationina- β -sintetase poderia ser considerada fator de risco para a elevação da homocisteína (CLARKE et al., 1991); mas, segundo ENGBERSEN et al. (1995), esta condição não é comum nos portadores de patologia vascular. Pacientes com deficiência nutricional de folatos e cobalaminas terão níveis elevados de homocisteína plasmática (SELHUB et al., 1993).

A homocisteína também pode elevar-se devido a fatores genéticos, como mutações na metilenotetraidrofolato-redutase (MTHFR), enzima envolvida na remetilação da homocisteína, que forma metionina (ZITTOUN et al., 1998).

Recentemente reconheceu-se que a mutação genética denominada C677→ T no gen da MTHFR, com diminuição da atividade da MTHFR e com elevação da concentração da homocisteína no plasma, amplifica o risco de doença vascular (FODINGER et al., 2000).

Atualmente pode-se pesquisar o MTHFR genótipo que foi denominado TT genótipo que, se presente, indica risco de doença arterial, principalmente na população que apresente ácido fólico baixo (TOKGOZOGLU et al., 1999). Em crianças foi demonstrado que a associação de homocisteína em níveis séricos de 8,3 $\mu\text{mol/l}$ e TT genótipo, é risco significativo para trombose venosa. (KOCH et al., 1999).

2.3 AÇÃO DA HOMOCISTEÍNA SOBRE O ENDOTÉLIO

Estudos epidemiológicos revelam que pessoas com homocisteína elevada têm risco aumentado de serem acometidas de doença cardiovascular (BLACHER et al., 1999; TEMPLE et al., 2000; ANDREOTTI Fº et al., 2000). Estudos clínicos e experimentais sugerem que concentrações anormalmente elevadas de homocisteína podem ser responsáveis por tendências aterogênicas e trombóticas em pacientes com hiper-homocisteinemia, embora o mecanismo exato de sua ação ainda não tenha sido completamente elucidado (NYGARDL et al., 1999; VENTURA et al., 2000). A principal causa de morbidade e mortalidade em pacientes com homocistinúria clássica é a doença cardiovascular prematura freqüentemente aparecendo na primeira infância (Mc CULLY, 1969).

Os conhecimentos de que lesões no endotélio vascular são o início da aterogênese datam desde VIRCHOW em 1850. ROSS e GLOMSET (1976), estudaram o mecanismo da lesão vascular e aterogênese. Vários estudos analisaram os efeitos citotóxicos diretos da homocisteína sobre o crescimento de

células endoteliais em culturas de tecido (STARKEBAUM e HARLAN, 1986; DUDMAN et al., 1991). WALL et al. (1980), usando a substância D, L-homocisteína tiolactona, produziram lesão nas células endoteliais de diferentes vasos, na dependência da respectiva concentração. Esta lesão era prevenida pela catalase, sugerindo a participação importante do peróxido de hidrogênio no processo patológico. O peróxido de hidrogênio foi produzido pela oxidação da homocisteína na presença de cobre; as células endoteliais, em culturas expostas à homocisteína, só foram lesadas após a adição de cobre (STARKEBAUM e HARLAN, 1986).

HARKER et al. (1974), infundindo continuamente L-homocisteína durante cinco dias em babuínos, produziram descamação em placas do endotélio vascular, assim como a diminuição do tempo de sobrevivência das plaquetas. Concluíram que a formação de trombo arterial em pacientes homocistinúricos, resulta da lesão arterial produzida pela homocisteína.

Neste estudo e em outro realizado em 1983 (HARKER et al., 1983), foram administrados agentes antiplaquetários, que induziram alguns dos efeitos trombóticos adversos; estes achados, obtidos em babuínos não foram observados em outras espécies animais, como suínos (REDDY e WILCKEN, 1982; SMOLIN et al., 1983), coelhos (DONAHUE et al., 1974) e macacos (KRISHNASWAMY e RAO, 1977). Estes estudos sugerem que as respostas dependem da espécie animal envolvida nos estudos. Em 1995, ROLLAND et al., estudando suínos submetidos à dieta rica em metionina, observaram concentrações elevadas de homocisteína após quatro meses do uso dessa dieta, e dois entre dezesseis animais desenvolveram tromboembolos. Além disto, foram observadas alterações patológicas na lâmina elástica das artérias desses animais. A prostaciclina é potente inibidor da agregação plaquetária. A redução na síntese desta substância poderia ser fator predisponente à trombose, porém os efeitos da homocisteína na síntese da prostaciclina são conflitantes (PANGANAMALA et al., 1986; WANG et al., 1993). O óxido nítrico, relaxador do endotélio, pode proteger contra os efeitos da homocisteína, proteção esta que pode ser perdida com a prolongada exposição do endotélio à homocisteína (STAMLER et al., 1993).

TSAI et al. (1994) relataram que o efeito promotor, do crescimento da homocisteína sobre células do músculo liso vascular, junto com seu efeito inibidor sobre o crescimento das células endoteliais, representa um mecanismo importante para elucidar a aterosclerose produzida pela homocisteína. WOO et al. (1997) demonstraram esse fato, usando ultra-som de alta resolução, o que induziu alterações no endotélio arterial, que foram precursoras de arterioesclerose precoce, em pacientes adultos assintomáticos, porém com homocisteína entre $34,8 \pm 8.5$ $\mu\text{mol/l}$.

Portadores de hiper-homocisteinemia com disfunção endotelial apresentaram processo de oxidação elevada no endotélio, que se reduz com administração de folato, sugerindo que a disfunção endotelial é causada por mecanismo de peroxidação (Mc DOWELL , 2000).

CHAO et al. (2000) acreditaram que a lesão no endotélio estava associada à diminuição da atividade do óxido nítrico e não à mudança do estado oxidativo endotelial. O trabalho de DEMUTH et al. (1999) demonstra que a homocisteína plasmática elevada diminui a produção de prostaciclina e de óxido nítrico pelo endotélio. Colocando-se células endoteliais humanas na presença de homocisteína, há diminuição da secreção do agente vasoconstritor, endotelina 1, e seletivamente pode prejudicar o efeito vasodilatador do endotélio pela inibição na produção da endotelina, CHEN et al. (2000) demonstraram, em culturas de células do músculo liso da parede arterial de seres humanos e de carótidas de suínos, que a homocisteína tem efeito prejudicial na proliferação das células do músculo liso e efeito citotóxico nas células endoteliais. Avaliando o efeito da hiper-homocisteinemia sobre a vasoconstrição adrenérgica na resistência arterial, CIPOLLA et al. (2000) concluíram que a elevação da homocisteína plasmática diminui a contração adrenérgica arterial.

2.4 AÇÃO DA HOMOCISTEÍNA NOS FATORES DE COAGULAÇÃO

A homocisteína afeta diversos fatores envolvidos na coagulação. O aumento na tendência de trombose intravascular tem sido associado à baixa atividade da antitrombina. GIANNINI et al. (1975) mostraram significativa redução da atividade antitrombina em sete pacientes com homocistinúria, comparados com sete pacientes controle. PALARETI e COCCHERI (1989) encontraram resultado semelhante, porém normalizaram a atividade da antitrombina, utilizando piridoxina e ácido fólico, mesmo com níveis elevados de homocisteína, sugerindo que estas substâncias desempenham papel específico e independente da homocisteína, na correção desta anormalidade da coagulação.

Diversos estudos *in vitro* demonstraram que a homocisteína promove atividade pró-coagulante. O endotélio vascular possui múltiplas propriedades pró-coagulantes, incluindo a síntese do fator V. RODGERS e KANE (1986), tratando a cultura de células endoteliais com 0,5 a 10 μ mol de de homocisteína, observaram aumento na atividade do fator V e na ativação da protombina pelo fator Xa. A proteína C regula a interação das células endoteliais com o fator V. RODGERS e CONN (1990) observaram inibição máxima de 90% na ativação da proteína C, quando as culturas de células endoteliais arteriais e venosas eram tratadas com 7,5 a 10 μ mol/litro de homocisteína, após seis a nove horas de incubação. Estes dados sugerem que este fator pode contribuir para a tendência trombótica em pacientes com hiper-homocisteinemia, LENTZ e SADLER (1991) demonstraram que a homocisteína inibe o transporte da trombomodulina através das vias secretórias das células endoteliais. A trombomodulina é uma glicoproteína anticoagulante da superfície endotelial e serve como co-fator para a ativação da proteína C pela trombina. A homocisteína inibe também a atividade do co-fator da trombomodulina da superfície celular (HAYASHI et al., 1992). NISHINAGA et al. (1993), analisando outro mecanismo anticoagulante das células endoteliais, isto é, as interações glicosamina-glican-antitrombina III, demonstraram que as células endoteliais da aorta de porcos tratada com homocisteína, perderam sua capacidade de ligação com a antitrombina III. LENTZ e SADLER (1993) verificaram que a homocisteína inibe a secreção do fator de Von Willebrand. "In vitro", a homocisteína inibe a

tromborresistência das células endoteliais por redução de fatores pró-coagulantes, inativando o sistema anticoagulante e suprime os fatores vasodilatadores e aumenta a capacidade de as plaquetas se agruparem. A homocisteína também inibe o sistema fibrinolítico, dificultando a ligação do plasminogênio com o ativador do plasminogênio plasmático. (LING e HAJJAR, 2000); portanto a homocisteína é trombogênica, aumenta a formação do tromboxano, acentua a ligação da lipoproteína em fibrina, antagoniza o óxido nítrico e aumenta a agregação plaquetária, inibe a proteína C; a trombomodulina e ativa o fator XII da coagulação. (Mc CULLY, 1966).

2.5 HOMOCISTEÍNA E DOENÇA VASCULAR

Em 1991, CLARKE et al. compararam os níveis de homocisteína após sobrecarga com metionina em pacientes com doença vascular precoce, pacientes com menos que 55 anos de idade, com aqueles em indivíduos normais. Foi observada hiper-homocisteinemia em 42% dos pacientes com doença vascular cerebral, 28% com doença vascular periférica e 30% com doença arterial coronariana, porém em nenhum dos indivíduos controle. Após ajuste para os fatores de risco convencionais, a chance ao acaso para a doença vascular em pacientes com hiper-homocisteinemia foi de 3,2, valor este, mais elevado que aquele para o tabagismo ou para a hipercolesterolemia. Aproximadamente 80% dos pacientes portadores de concentrações elevadas de homocisteína apresentaram baixa atividade da cistationina- β -sintetase. CLARKE et al. concluíram que a hiper-homocisteinemia é fator de risco independente para a doença vascular, incluindo coronariopatia; e a deficiência parcial da cistationina- β -sintetase foi a causa mais freqüente da hiperhomocisteinemia, mesmo quando os níveis de vitamina B12 e folatos eram mais baixos em pacientes com concentrações elevadas de homocisteína. Estudos da Cleveland Clinic e outros centros nos Estados Unidos e Europa sugerem maior risco de doença cardiovascular, associados a elevações crescentes na concentração de homocisteína plasmática (ROBINSON, 1996).

Acredita-se que novas pesquisas ajudarão a identificação mais precisa do nível de homocisteína que predispõem à doença vascular, e melhor definição das

concentrações normais. Em estudo realizado em dezenove centros localizados em nove países europeus, analisando 750 casos de doença vascular aterosclerótica (cardíaca, cerebral e periférica), observou-se que indivíduos com níveis de homocisteína plasmática total em jejum iguais ou superior a 12 $\mu\text{mol/litro}$ e após sobrecarga de metionina, níveis iguais ou superiores a 38 $\mu\text{mol/litro}$, ou seja, compreendidos no quinto superior da distribuição controle, apresentavam aumento de duas vezes no risco para doença vascular, comparados com os quatro quintos restantes. Este nível de risco foi equivalente ao da hipercolesterolemia ou do tabagismo e aplicado a todas as categorias de doença vascular. O risco estimado foi também independente do efeito de outros fatores de risco (GRAHAM et al., 1997).

Em outro estudo realizado em 1997, NYGARD et al. analisaram o valor prognóstico da homocisteína.

Foi estudada prospectivamente a relação entre os níveis de homocisteína plasmática e a mortalidade de 587 pacientes com doença arterial coronariana comprovada angiograficamente. Após o seguimento médio de 4,6 anos, 64 pacientes (10,9%) tinham falecido; destes, 3,8% apresentavam níveis de homocisteína abaixo de 9 $\mu\text{mol/litro}$, e 24,7% níveis iguais ou superiores a 15 $\mu\text{mol/litro}$, e 24,7% níveis iguais ou superiores a 15 $\mu\text{mol/litro}$. Os autores concluíram que os níveis elevados de homocisteína plasmática são indicadores de mortalidade em pacientes com doença arterial coronariana.

O risco associado à hiper-homocisteinemia depende da sua concentração plasmática e não da sua associação aos fatores de risco tradicionais para a arterioesclerose obliterante, sendo estimado em 1,4 vezes para cada 5 $\mu\text{mol/litro}$ de aumento do total da homocisteína plasmática. (ANDREOTTI et al., 1999).

A homocisteína elevada no plasma acima de 95% está associada com 2 a 3 vezes o risco relativo de trombose venosa e embolismo pulmonar. (WUILLEMIN et al., 1999).

A hiper-homocisteinemia também está associada ao aumento da hiperplasia intimal nos enxertos venosos (BEATTIE, 1999).

Um estudo realizado na Universidade Federal do Paraná em 195 pacientes com idade inferior a 55 anos submetidos a cinecoronariografia, indicou que pacientes com doença arterial coronariana apresentam níveis de homocisteína plasmática mais elevados do que indivíduos sem esta doença, indicando comportar-se como fator de risco para aterosclerose coronariana.

A homocisteína plasmática não apresenta correlação com outros fatores de risco para aterosclerose, como: hipertensão arterial, diabetes melito, tabagismo, sedentarismo, história familiar de coronariopatia, colesterol, HDL colesterol, LDL colesterol, triglicérides, apolipoproteínas AI, AII, B e E, Lp (a) e fibrinogênio. (SOUZA, A.M., 1997).

A teoria da aterosclerose causada pela homocisteína foi primeiramente proposta por Mc CULLY e WILSON (1975), e explica por que a homocisteína é considerada fator de risco. Outros estudos (CLARKE et al., 1991; Von ECKARDSTEIN et al., 1994; GRAHAM et al., 1997) concluíram que a homocisteína é fator de risco independente para a doença arterial.

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foram utilizados neste estudo 20 coelhos da raça Albinos New Zealand com peso médio de 2000 ± 456 gramas.

Estes coelhos foram mantidos no biotério do Laboratório de Pesquisas da Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da Universidade Federal do Paraná. Ao chegar ao biotério, foram pesados e examinados por veterinário, com o objetivo de evitar a inclusão de coelhos portadores de alguma doença contagiosa ou que pudesse comprometer o desenvolvimento de algum experimento. O biotério é equipado de sistema de exaustão e ventilação com temperatura controlada, permitindo manter o ambiente em torno de 21° Celsius. Os animais foram colocados em gaiolas de arame resistente, colocadas sobre recipientes apropriados para o recolhimento dos dejetos. As gaiolas são equipadas de vidros com bicos que permitem a sucção de água pelos animais e com um recipiente onde é acondicionada a ração para coelhos, (Ração para Roedores Nutriara), permanecendo nestas condições por sete dias para sua adaptação.

As normas técnicas adotadas neste estudo seguiram as orientações determinadas pela Associação Brasileira de Normas Técnicas e as Normas para Apresentação de Trabalhos da Universidade Federal do Paraná (2000).

Foram adotados os princípios éticos para experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (1994).

3.2 DESCRIÇÃO DO PROTOCOLO

Após o período de adaptação, os coelhos foram divididos aleatoriamente em dois grupos e numerados de 1 a 10 grupo controle (grupo C) e 11 à 20 (grupo M).

Os animais do grupo C foram alimentados com ração para coelhos Nutriara e água potável *ad libitum*.

Aos animais do grupo M foi ofertada a mesma ração do grupo C e em 500ml de água acrescentaram-se 2ml de solução de metionina com 200mg/ml de metionina

a cada 24 horas. Todos os coelhos (grupo C e M) permaneceram com suas dietas por 60 dias.

3.3 DOSAGENS SANGÜÍNEAS

Foram colhidas amostras de sangue para dosagem de colesterol, triglicerídios, HDL, LDL e homocisteína nos 0, 30 e 60 dias.

As dosagens do colesterol, triglicerídios, LDL e HDL foi pelo método enzimático-colorimétrico. A homocisteína foi dosada pelo método H.P.L.C (cromatografia líquida de alta performance).

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a comparação dos grupos, em cada um dos momentos e em relação a cada uma das variáveis, testou-se a hipótese nula de médias iguais, versus a hipótese alternativa de médias diferentes. Para a verificação destas hipóteses adotou-se a Análise Covariância, controlando-se os pesos dos coelhos e testando-se a homogeneidade das variâncias por meio do teste de Cochran. Para a comparação dos momentos, testou-se a hipótese nula de médias iguais entre os dois momentos sob comparação, versus a hipótese de médias diferentes. Para tanto, adotou-se o teste t de Student para amostras pareadas. Em todos os testes considerou-se o nível de significância de 5%. (KIRK, 1982).

3.5 ESTUDO ANATOMOPATOLÓGICO

Os animais foram submetidos à eutanásia, por dose letal de Thiobarbiturato Etil Sódico (Thionembital[®]) e Pancurônio (Pavulon[®]).

Foram retiradas a aorta torácica e a aorta abdominal, peças que foram fixadas em solução de formol a 10% e encaminhadas ao estudo anatomopatológico.

Foi realizado exame macroscópico, avaliando-se comprimento, diâmetro e espessura máxima da parede da aorta.

Enviaram-se para exame microscópico segmentos da porção distal, medial e proximal das aortas.

3.5.1 Preparo Técnico

O material foi processado em autotécnico (JUNG – Histokinette – 2000) e então montado em blocos de parafina. Realizaram-se cortes dos blocos em micrótomo (A.O. American Optical 820) de 4-7 μ m de espessura, sendo colocados em lâminas de vidro, tratadas com albumina. As lâminas foram coradas em hematoxilina-eosina e feitas colorações especiais para fibras elásticas pela técnica de Weigert e Tricrômio de Mallori; em seguida, montadas com bálsamo e lamínula.

3.6 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

Foram avaliados todos os cortes de aorta, do grupo M e do grupo C, em lâminas coradas por hematoxilina e eosina, preparados histológicos para avaliação de fibras colágenas

Analisou-se a túnica íntima quanto à espessura, revestimento endotelial, presença ou ausência de depósitos subendoteliais e tipo de células encontradas. Observou-se a túnica média, sua espessura, proporção de fibras elásticas e colágenas e a integridade destas. Examinou-se ainda a presença ou ausência de depósitos, alterações arquiteturais e tipos celulares encontrados.

Avaliou-se a adventícia quanto à celularidade e alterações arquiteturais.

4 RESULTADOS

4.1 PESO DOS ANIMAIS

Os animais foram pesados na chegada ao biotério e no 60º dia da experimentação. Na primeira avaliação, no dia da chegada ao biotério, os coelhos dos grupos C e M não apresentaram diferença significativa. No 60º dia da pesquisa, também não houve diferença significativa entre os grupos; portanto, em relação ao peso tanto inicial como final, os grupos não diferem entre si. A tabela 1 demonstra o peso médio dos coelhos juntamente com o desvio padrão destes pesos nos momentos do experimento.

TABELA 1 – PESO DOS ANIMAIS EM GRAMAS DURANTE O EXPERIMENTO

MOMENTO	GRUPO	MÉDIA
O dia	Controle	2255,50
	Experimento	2252,40
30 dias	Controle	2260,80
	Experimento	2270,00
60 dias	Controle	2294,60
	Experimento	2299,00

4.2 DOSAGENS BIOQUIMICAS

4.2.1 Níveis Séricos de Lipoproteínas de Alta Densidade (HDL) e de Baixa Densidade (LDL)

As dosagens séricas de HDL e LDL foram realizadas simultaneamente às de colesterol e triglicerídeos. Não se observou diferença significativa dos níveis séricos das lipoproteínas nos dois grupos. (Tabelas 2 e 3)

TABELA 2 – NÍVEIS DE HDL (mg/dl)

MOMENTO	GRUPO	MÉDIA	VALOR DE p	DESVIO PADRÃO	VALOR DE p
0 dia	Controle	12,42	0,0029	2,4075	0,3715
	Experimento	15,69		1,7685	
30 dias	Controle	12,51	0,0059	2,3073	0,3290
	Experimento	15,40		1,6465	
60 dias	Controle	13,23	0,0247	2,5939	0,2698
	Experimento	15,74		1,7696	

Rejeitou-se a hipótese de igualdade de médias entre os grupos em todos os momentos, no nível de significância de 5%. Não rejeitou-se a hipótese de homogeneidade de variâncias em todos os momentos, no nível de significância de 5%.

Para o grupo experimento, comparando-se as médias nos diferentes momentos, obtiveram-se os seguintes resultados:

Comparação	Valor de p
0 dia x 30 dias	0,0372
30 dias x 60 dias	0,0355
0 dia x 60 dias	0,2443

GRÁFICO 1 – HDL (mg/dl) MÉDIO DO GRUPO C e DO GRUPO M

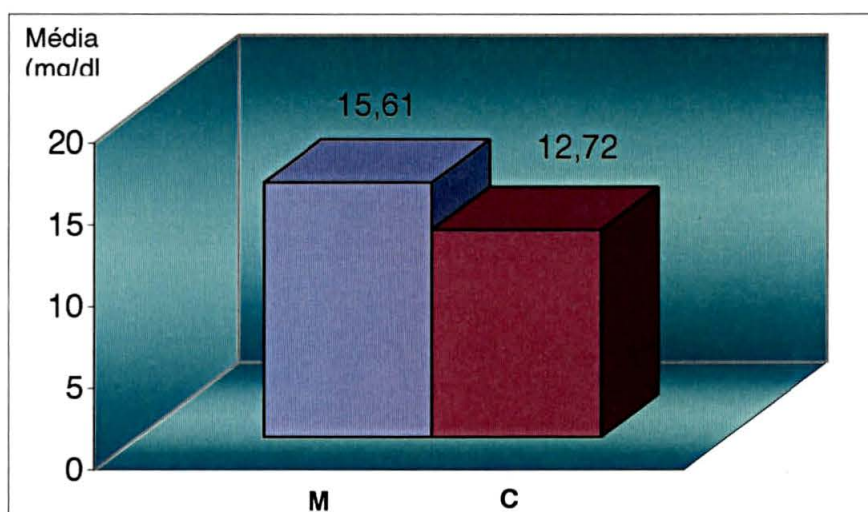


TABELA 3 – NÍVEIS DE LDL (mg/dl)

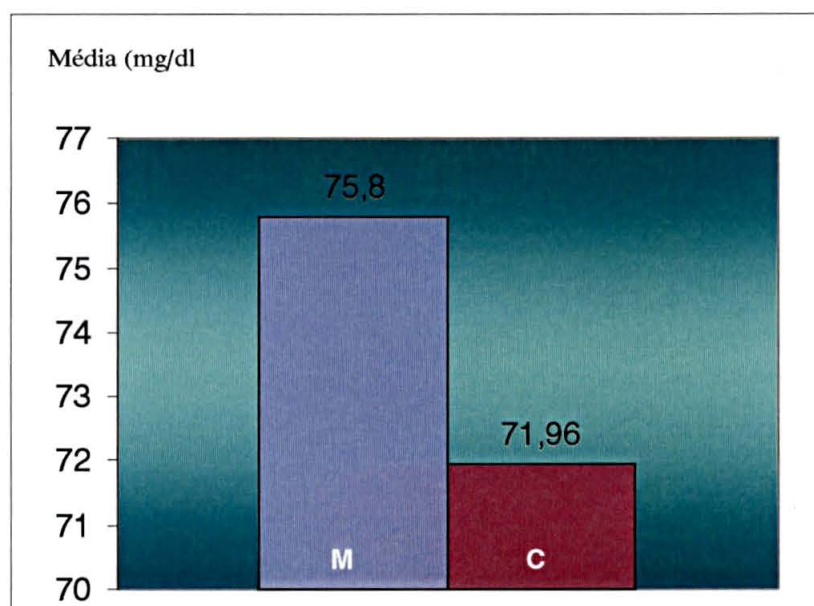
MOMENTO	GRUPO	MÉDIA	VALOR DE p	DESVIO PADRÃO	VALOR DE p
0 dia	Controle	71,40	0,4160	15,3637	0,2167
	Experimento	76,30		10,0006	
30 dias	Controle	71,30	0,5411	15,3627	0,2266
	Experimento	75,10		10,0935	
60 dias	Controle	73,20	0,6373	14,5511	0,3244
	Experimento	76,00		10,3495	

Não se rejeitou a hipótese de igualdade de médias entre os grupos em todos os momentos, no nível de significância de 5%. Também não se rejeitou a hipótese de homogeneidade de variâncias em todos os momentos, no nível de significância de 5%.

Para o grupo experimento, comparando-se as médias nos diferentes momentos, obtiveram-se os seguintes resultados:

Comparação	Valor de p
0 dia x 30 dias	0,0086
30 dias x 60 dias	0,1467
0 dia x 60 dias	0,5910

GRÁFICO 2 – NÍVEIS MÉDIOS DO LDL DO GRUPO C e M



4.2.2 Dosagens de Colesterol Total

Não foi verificada diferença significativa nos níveis de colesterol total nos dois grupos. Em relação ao nível sérico de colesterol, os dois grupos não diferem significativamente entre si (tabela 4).

TABELA 4 – COLESTEROL SÉRICO (mg/dl)

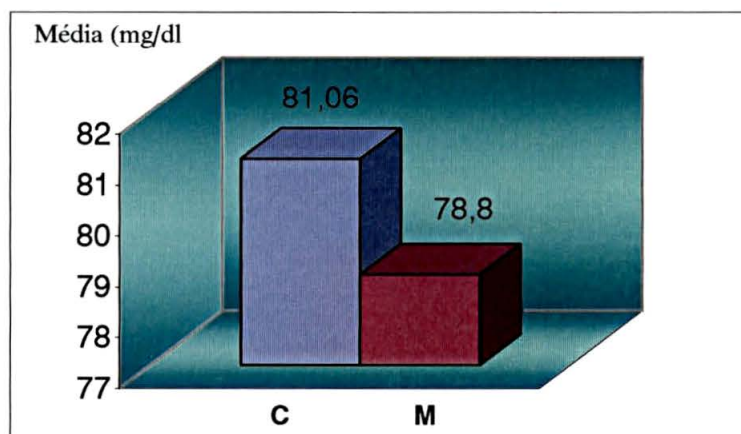
MOMENTO	GRUPO	MÉDIA	VALOR DE p	DESVIO PADRÃO	VALOR DE p
0 dia	Controle	81,60	0,3341	5,0155	0,4929
	Experimento	79,10		6,3500	
30 dias	Controle	80,50	0,2293	4,0893	0,2694
	Experimento	77,80		5,9963	
60 dias	Controle	81,10	0,4804	3,2128	0,0599
	Experimento	79,50		6,2583	

Não se rejeitou a hipótese de igualdade de médias entre os grupos em todos os momentos, no nível de significância de 5%. Também não se rejeitou a hipótese de homogeneidade de variâncias em todos os momentos, no nível de significância de 5%.

Para o grupo experimento, comparando-se as médias nos diferentes momentos, obtiveram-se os seguintes resultados:

Comparação	Valor de p
0 dia x 30 dias	0,0224
30 dias x 60 dias	0,0192
0 dia x 60 dias	0,1678

GRÁFICO 3 – COLESTEROL MÉDIO (mg/dl) NO GRUPO C e M



4.2.3 Dosagem de Triglicerídeos

O nível sérico de triglicerídeos não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos C e M.

TABELA 5 – TRIGLICERÍDEOS (mg/dl) SÉRICO DOS ANIMAIS

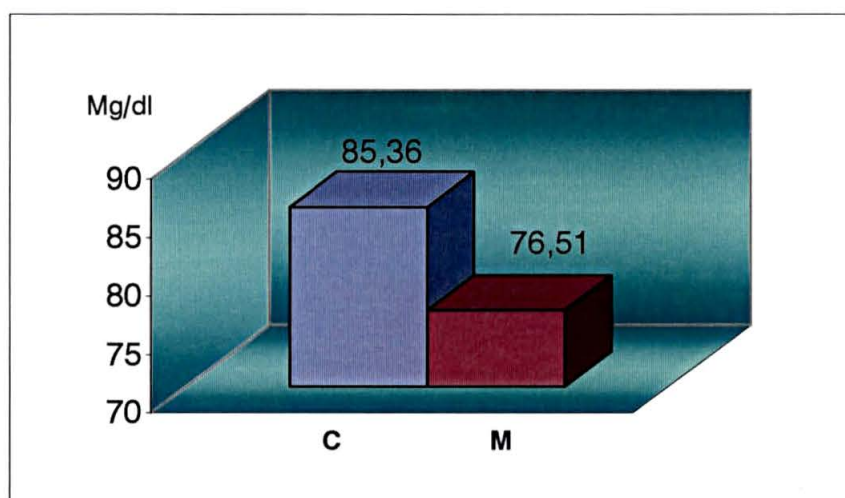
MOMENTO	GRUPO	MÉDIA	VALOR DE p	DESVIO PADRÃO	VALOR DE p
0 dia	Controle	84,68	0,2836	17,8002	0,2639
	Experimento	76,95		12,0841	
30 dias	Controle	84,90	0,1894	17,3874	0,3376
	Experimento	75,50		12,4833	
60 dias	Controle	86,50	0,1865	17,8216	0,2483
	Experimento	77,10		11,9392	

Não se rejeitou a hipótese de igualdade de médias entre os grupos em todos os momentos, no nível de significância de 5%. Também não se rejeitou a hipótese de homogeneidade de variâncias em todos os momentos, no nível de significância de 5%.

Para o grupo experimento, comparando-se as médias nos diferentes momentos, obtiveram-se os seguintes resultados:

Comparação	Valor de p
0 dia x 30 dias	0,0077
30 dias x 60 dias	0,0133
0 dia x 60 dias	0,3434

GRÁFICO 4 – TRIGLICERÍDEOS (mg/dl) MÉDIO DO GRUPO C e DO GRUPO M



4.2.4 Níveis de Homocisteína ($\mu\text{mol/l}$)

Houve alteração significativa entre os níveis de homocisteína entre o grupo com dieta rica em metionina e o grupo controle no período de 2 meses. O aumento da homocisteína plasmática já foi comprovado no 30º dia, com progressão dos níveis séricos até a última dosagem no 60º dia.

TABELA 6 – NÍVEIS SÉRICOS DA HOMOCISTEÍNA ($\mu\text{mol/l}$)

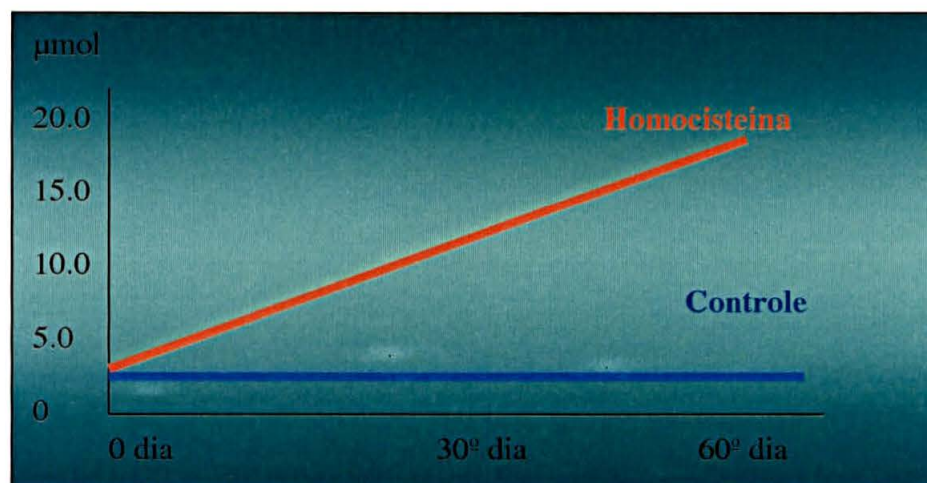
MOMENTO	GRUPO	MÉDIA	VALOR DE p	DESVIO PADRÃO	VALOR DE p
0 dia	Controle	3,67	0,1181	0,4347	0,8687
	Experimento	3,35		0,4601	
30 dias	Controle	3,65	< 0,0001	0,4378	0,0326
	Experimento	11,10		1,6633	
60 dias	Controle	3,70	< 0,0001	0,4163	0,9524
	Experimento	16,19		0,9267	

Os valores de p para os momentos 30 dias e 60 dias foram calculados com os resultados transformados com a operação de raiz quadrada. Isto se deveu ao fato de ter-se rejeitado a hipótese de homogeneidade de variâncias, fazendo-se a transformação para se atingir o pressuposto do teste. Apesar de no momento 30 dias continuar se rejeitando a hipótese de homogeneidade de variâncias, o valor de p do teste de igualdade de médias pode ser considerado em função de os dois grupos terem o mesmo número de animais, o que garante a robustez do teste.

Para o grupo experimento, comparando-se as médias nos momentos, obteve-se os seguintes resultados:

Comparação	Valor de p
0 dia x 30 dias	< 0,0001
30 dias x 60 dias	0,00001
0 dia x 60 dias	< 0,0001

GRÁFICO 5 – PROGRESSÃO DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DA HOMOCISTEÍNA DO 0 DIA AO 60º DIA NOS GRUPOS



4.3 RESULTADOS DO EXAME ANATOMOPATOLÓGICO

4.3.1 Resultado Macroscópico

Coelhos do grupo C:

As aortas mediam em média 8cm de comprimento e 0,5cm de diâmetro. Superfície externa recoberta por tecido liso e de coloração esbranquiçada, com menos de 0,1cm de espessura e luz com material vinhoso e friável.

Coelhos do grupo M:

As aortas mediam em mediam 8cm de comprimento e 0,5cm de diâmetro. Superfície externa recoberta por tecido liso e de coloração esbranquiçada com 0,2cm de espessura e luz com material vinhoso e friável.

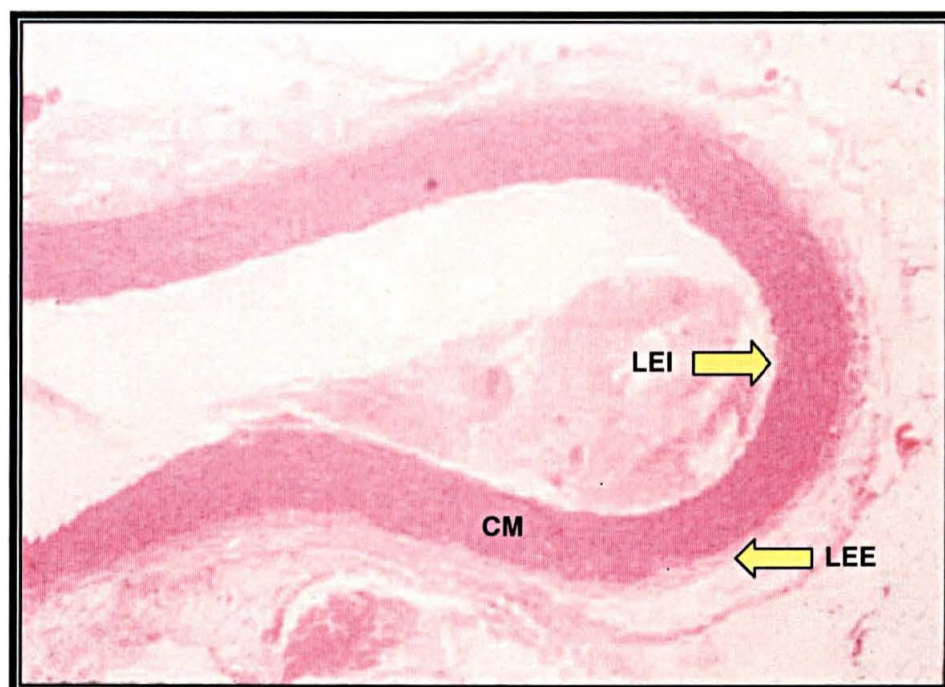
4.4 RESULTADOS SO EXAME MICROSCÓPICO

Coelhos do grupo C:

Os achados foram semelhantes em todas as aortas examinadas neste grupo. Encontrou-se túnica íntima delgada, revestida por camada de células endoteliais,

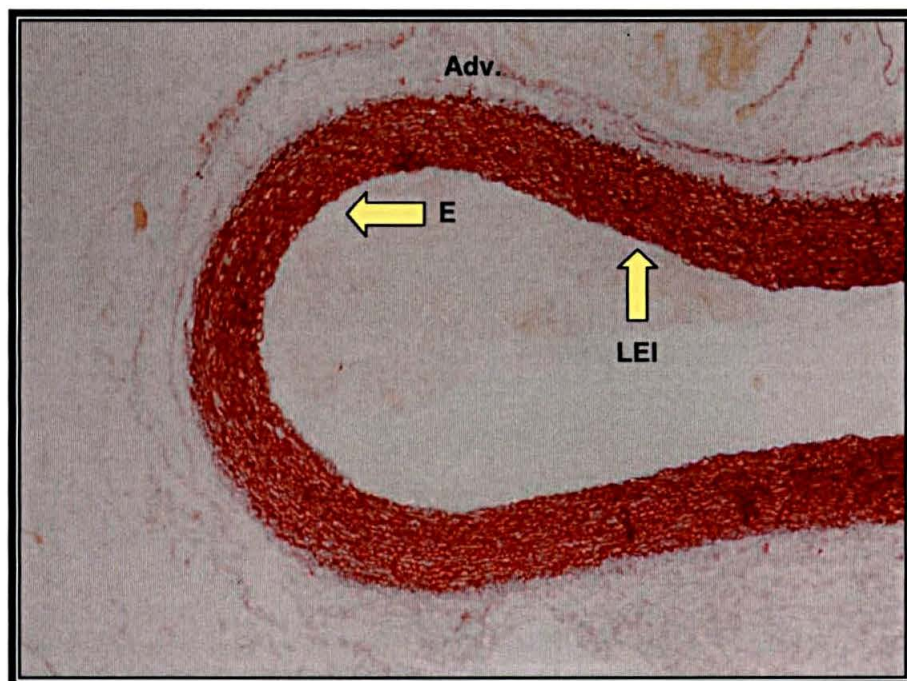
apoiada em espesso tecido conjuntivo subendotelial, com colágeno e fibras elásticas. Ausência de depósitos subendoteliais. Túnica média, com camada compacta de fibras elásticas, formando a lâmina elástica interna. Predomínio das fibras elásticas sobre as colágenas, que formam camadas fenestradas e compactas. Esparsas células musculares lisas entre as fibras colágenas. Ausência de células inflamatórias. Presença de membrana elástica externa mal definida. Túnica adventícia mal definida, formada por tecido conjuntivo frouxo onde se observam esparsas fibras nervosas e elásticas e pequenos vasos de paredes finas.

FIGURA 3 – FOTOMICROGRAFIA DA AORTA DO COELHO DO GRUPO C. COLORAÇÃO HEMATOXILINA-EOSINA. AUMENTO DE 40 VEZES



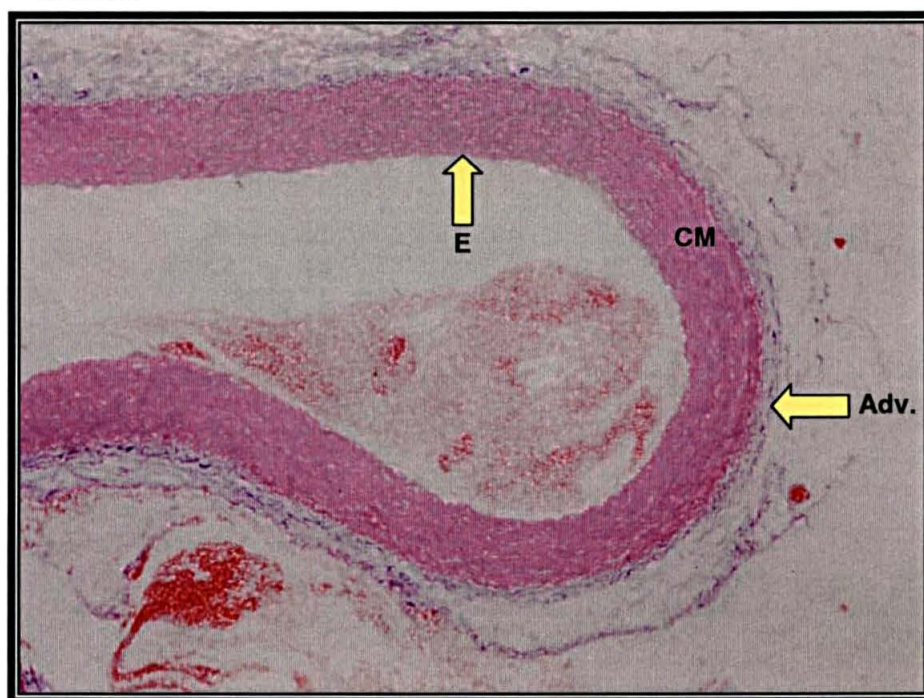
A figura mostra membrana limitante elástica interna bem definida. Camada muscular nítida e íntegra. Limitante elástica externa não bem definida.

FIGURA 4 – FOTOMICROGRAFIA DA AORTA DO COELHO DO GRUPO C. COLORAÇÃO PARA FIBRAS ELÁSTICAS PELA TÉCNICA DE WEIGERT. AUMENTO DE 40 VEZES



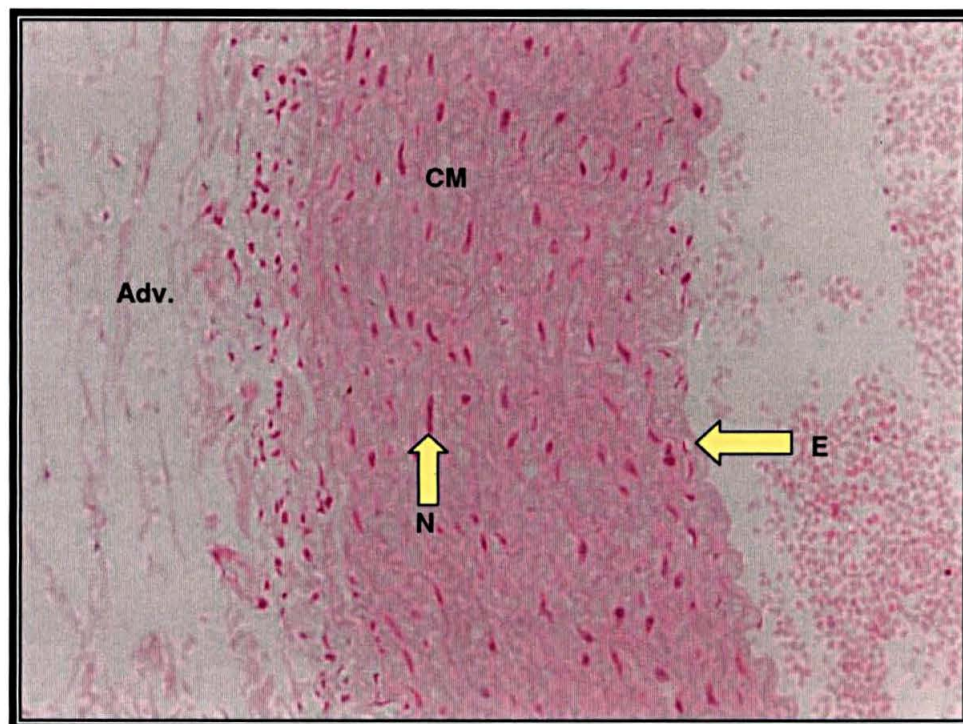
A figura mostra endotélio e limitante elástica interno bem definida, camada muscular sem anormalidades. Adventícia irregular.

FIGURA 5 – FOTOMICROGRAFIA DA AORTA DO COELHO DO GRUPO C. COLORAÇÃO PELO TRICRÔMIO DE MALLORI. AUMENTO DE 40 VEZES



A figura mostra ausência de fibras colágenas. Endotélio, camada muscular e adventícia sem alterações.

FIGURA 6 – FOTOMICROGRAFIA DA AORTA DO COELHO DO GRUPO C. COLORAÇÃO HEMATOXILINA-EOSINA. AUMENTO DE 200 VEZES



A figura mostra endotélio bem definido, células musculares lisas com núcleo alongado, bordas rombas e citoplasma sem limites precisos. Adventícia com irregularidades.

Coelhos do grupo M

Os achados foram semelhantes em todas as preparações examinadas deste grupo. Encontrou-se túnica íntima hiperplasiada com endotélio preservado e presença de depósitos subendoteliais, nos cortes proximais, formando placas descontínuas e em estágio inicial e nos cortes distais, placas envolvendo toda a circunferência do vaso e de maior espessura.

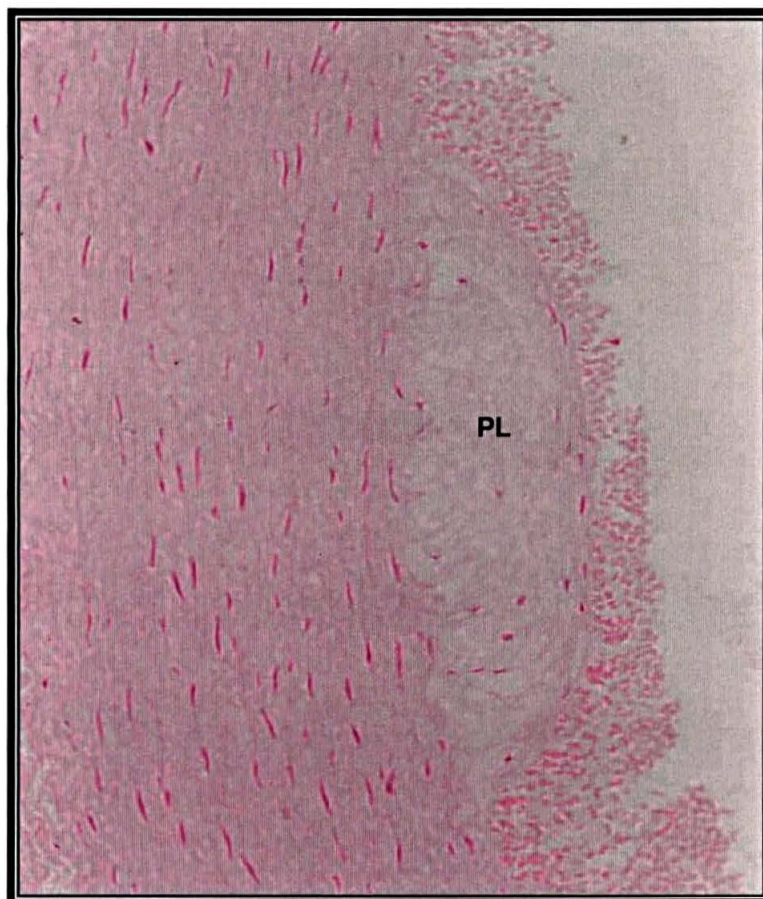
As placas são formadas por macrófagos espumosos e tecido conjuntivo, com esparsas fibras colágenas e elásticas.

Não foram observadas células musculares lisas, cristais de colesterol ou células inflamatórias. Túnica média, com uma camada compacta de fibras elásticas, formando a lâmina elástica interna, que se encontrava íntegra. Predomínio de fibras elásticas sobre as colágenas, que formam camadas fenestradas e compactas.

Esparsas células musculares lisas entre as fibras colágenas. Ausência de células inflamatórias. Presença de membrana elástica externa mal definida. Túnica

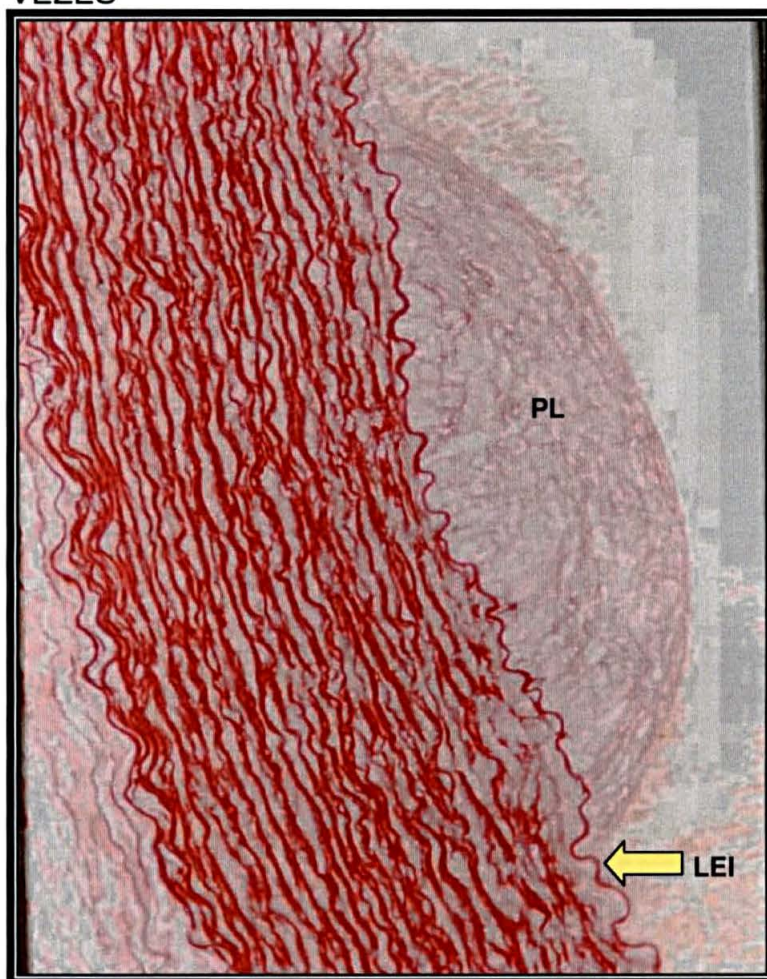
adventícia mal definida, formada por tecido conjuntivo frouxo, onde se observam esparsas fibras nervosas e elásticas e pequenos vasos de paredes finas. Ausência de células inflamatórias.

FIGURA 7 – FOTOMICROGRAFIA DA AORTA DO COELHO DO GRUPO M. COLORAÇÃO HEMATOXILINA-EOSINA. AUMENTO DE 200 VEZES



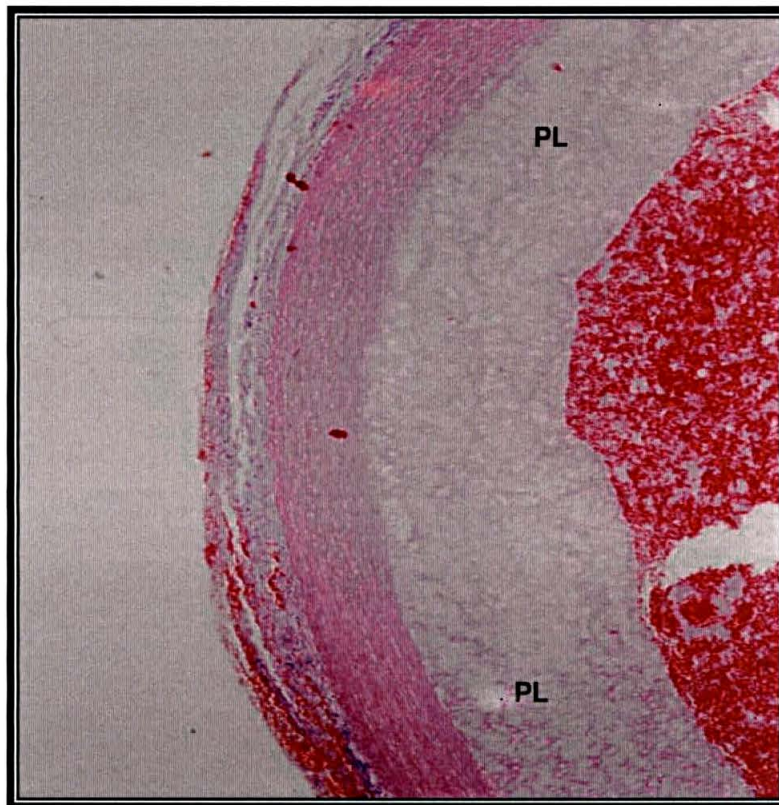
A figura mostra placa aterogênica formada de macrófagos (células espumosas); fazendo protusão na luz arterial.

FIGURA 8 – FOTOMICROGRAFIA DA AORTA DO COELHO DO GRUPO M. COLORAÇÃO PELA TÉCNICA DE WEIGERT. AUMENTO DE 200 VEZES



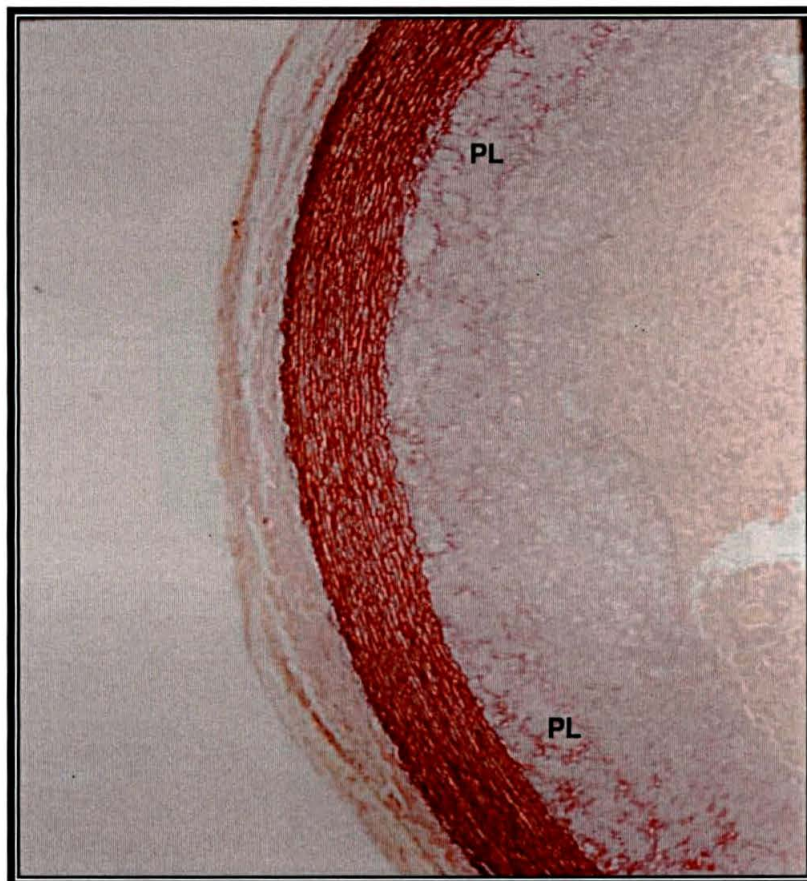
A figura mostra placa aterogênica, endotelial, rica em macrófagos (células espumosas). Limitante elástica interna bem definida.

FIGURA 9 – FOTOMICROGRAFIA DA AORTA DO COELHO DO GRUPO M. COLORAÇÃO PELO TRICRÔMIO DE MALLORI. AUMENTO DE 40 VEZES



A figura mostra extensa placa aterogênica, endotelial, formada por células espumosas com núcleo e citoplasma mal definidos.

FIGURA 10 – FOTOMICROGRAFIA DA AORTA DO COELHO DO GRUPO M. COLORAÇÃO PELA TÉCNICA DE WEIGERT. AUMENTO DE 40 VEZES



A figura mostra extensa placa aterogênica, endotelial, formada por macrófagos. Não houve coloração de fibras colágenas.

5 DISCUSSÃO

As causas da arterioesclerose permanecem desconhecidas, as pesquisas se voltam para a identificação dos fatores de risco, associados a esta doença. Não se conhecem a causa ou a cura desta doença que, direta ou indiretamente, afeta a vida de quase toda a população. Uma investigação sobre a etiologia da arterioesclerose deve fazer a distinção entre a arterioesclerose normalmente observada em pacientes, como evolução natural da vida, que aparece na 5^a, 6^a década ou mais de vida, sem nenhuma ou pouca manifestação clínica e a arteriosclerose doença, com aparecimento precoce e progressão rápida acometendo grupo etário mais jovem próximo aos 40 anos ou menos, associada a quadro de invalidez ou morte. Nos estudos da arterioesclerose sabe-se que ela pode ser intensificada pela presença de fatores de risco, que guardam relação de associação temporal e não relação de causa para esta doença.

Nos últimos 50 anos diversos fatores foram reconhecidos como risco para doença arterioesclerótica. Entre os mais tradicionais destacaram-se tabagismo (FOWKE, 1988), as dislipidemias, a hipertensão arterial, o diabetes melito, o sedentarismo, a obesidade, história familiar e sexo masculino. (LEVY, 1988); contudo pelo menos a metade dos pacientes que desenvolvem doença clínica não apresentam nenhum desses fatores (FUSTER, 1996). A identificação de outros marcadores, que aumentariam o risco de doença arterioesclerótica pode expandir o entendimento sobre os seus mecanismos fisiopatológicos e possibilitar o desenvolvimento de novas medidas preventivas ou terapêuticas. Dentre os novos fatores de risco identificados, está a lipoproteína (a), o fibrinogênio (RABELO et al., 1966), os estados de hipercoagulabilidade sangüínea, conhecidos como trombofilia (GEBARA, 1997), e a hiper-homocisteinemia. A teoria da aterosclerose causada pela homocisteína foi primeiramente proposta por MC CULLY e WILSON (1975); por si só, pode explicar o por que a homocisteína está sendo considerada como fator de risco. Os estudos de CLARKE et al., 1991; Von ECKARDSTEIN et al., 1994; GRAHAM et al., 1997, concluíram que a homocisteína é fator de risco independente para a doença arterial.

A homocisteína é um aminoácido não essencial e está recebendo grande atenção como fator de risco para as doenças cardiovasculares (BOUSHEY et al., 1995). É um produto intermediário formado durante o metabolismo da metionina que, por sua vez, é um aminoácido sulfurado essencial. A metionina é metabolizada com a formação do intermediário S-adenosilmetionina, importante doador de metilas em diversas reações de transmetilação. A S-adenosilmetionina é desmetilada, transformando-se em S-adenosil-homocisteína e, então, homocisteína. Em seguida, a homocisteína pode ser remetilada, voltando à metionina, ou seguir a via da transulfuração regulada pela enzima cistationina- β -sintetase, dependente da vitamina B6 e formar a cisteína e ser excretada pelo rim.

A via de remetilação da homocisteína de volta para metionina depende da presença de metilcobalamina (vitamina B12) e metiltetraidrofolato (folatos), que são co-fator e co-substrato dessa reação (MAYER et al., 1996).

Desde a descrição original de MC CULLY, em 1969, mediante observações em portadores da rara síndrome de homocisteinemia familiar, com implicações ateroscleróticas, começou a delinear-se o possível papel da homocisteína como fator de risco. Posteriormente, observou-se que, mesmo em indivíduos com níveis considerados dentro da faixa da normalidade, à semelhança do que acontecia com o colesterol, aqueles que estavam com os níveis mais elevados teriam maiores riscos de apresentar doença.

Diversos estudos prospectivos, caso-controle e longitudinais, demonstraram o seguinte: nos pacientes que desenvolveram complicações ateroscleróticas, os níveis de homocisteína eram consideravelmente mais elevados do que aqueles que não apresentavam a doença (BOUSHEY et al., 1995). Níveis acima de 15 $\mu\text{mol/l}$ duplicaram o risco de apresentar doenças cardiovasculares (BOERS, 2000). Os níveis plasmáticos de homocisteína correlacionam-se com idade, sexo masculino, tabagismo, hipertensão arterial, níveis de colesterol e sedentarismo (NYGARD et al., 1995); mas mesmo após ajuste para estes, seu papel como fator de risco permanece (MAYER et al., 1996). Assim como a doença coronária, a doença aterosclerótica da carótida (SELHUB et al., 1995) e a trombose venosa profunda (Den HEIJER et al., 1996) também são mais prevalentes em indivíduos com níveis elevados de homocisteína. Diversos mecanismos explicam os possíveis efeitos aterogênicos da homocisteína. É descrito o efeito citotóxico direto da homocisteína

sobre as células endoteliais (JONES et al., 1994) e possivelmente sobre a síntese de prostaciclina. Tem sido sugerido efeito sobre as plaquetas, aumentando sua adesividade e agregabilidade, favorecendo a trombose. Além disso, alguns estudos também demonstraram efeitos sobre fatores da coagulação, favorecendo a trombofilia com ativação do fator V. (MAYER et al., 1996).

5.1 HOMOCISTEÍNA E LIPOPROTEÍNA DE BAIXA DENSIDADE (LDL).

A lipoproteína de baixa densidade (LDL), maior proteína de transporte do colesterol no plasma humano, é fator de risco estabelecido para a aterosclerose (KANNEL e SYTROWSKI, 1987). A LDL pura não é fagocitada pelos macrófagos ou células musculares lisas em quantidade suficiente para causar acúmulo de lipídio intracelular. Quando o LDL é modificado pela oxidação, é reconhecido pelo receptor específico, que é diferente do receptor LDL. Este receptor existe nas células endoteliais e nos macrófagos. Os macrófagos fagocitam LDL oxidado e são convertidos em células espumosas. O seu acúmulo na íntima da parede arterial é o primeiro evento na aterogênese (STEINBERG et al., 1989; STEINBERG et al., 1990). A interação de homocisteína, lipoproteínas e colesterol envolve processo oxidativo alterado dentro da célula e desenvolve a placa de ateroma. A alta reatividade da forma anidra da homocisteína-tiolactona causa elevações nos níveis de triglicerídeos séricos, LDL e colesterol em animais de laboratório. Esta forma de homocisteína também reage em LDL e produz um agregado, forma densa de lipoproteína, que é fagocitada pelo macrófago, para formar as células espumosas. A homocisteína deste agregado, que é formado por ligações peptídicas entre os aminoácidos e os grupos amina da apoproteína B, modifica os processos oxidativos e biossintéticos das células da parede arterial, promovendo aterosclerose (NARUSZEWICZ et al., 1994). Segundo MC CULLY (1996), esta interessante interação de homocisteína e lipoproteínas no processo aterosclerótico pode ajudar a entender por que alguns pacientes podem estar livres da arterioesclerose, apesar dos níveis elevados de lipoproteínas e colesterol, e por que outros pacientes podem ter a doença, apesar de níveis de LDL e colesterol normais ou baixos. Com a evolução dos exames laboratoriais, permitindo-se dosar homocisteína total, homocisteína agregada à lipoproteína e homocisteína das lipoproteínas, será

possível avaliar com maior precisão os riscos nestes casos (MC CULLY, 1996). Atualmente já existe um trabalho que relaciona homocisteína e lipoproteína no aumento do risco de coronariopatia em adultos jovens, realizado na Cleveland Clinic com 750 homens e 430 mulheres com homocisteína igual ou superior $17\mu\text{mol/l}$ e com lipoproteína igual ou superior 30mg/dl . Neste estudo os resultados mostram que o aumento da homocisteína e da lipoproteína aumenta o risco de doença arterial coronária. (FOODY et al., 2000).

A homocisteína também é trombogênica: aumenta a formação de tromboxano, incrementando a ligação da lipoproteína e fibrina, antagoniza óxido nítrico, aumenta agregação plaquetária no sítio de dano na íntima arterial, inibindo a proteína e a trombomodulina e ativando o fator XII da coagulação (MC CULLY, 1996). Por meio destes diferentes estudos, os principais processos celulares e fisiopatológicos pelos quais a homocisteína promove a aterogênese foram delineados. Devido aos fatores dietéticos, genéticos, tóxicos ou hormonais, há uma diminuição na remetilação ou transulfuração da homocisteína-tiolactona, levando a uma produção aumentada de homocisteína-tiolactona, a partir da metionina. Homocisteína-tiolactona em excesso se liga a LDL e forma os agregados que são transportados no sangue e fagocitados pelos macrófagos vasculares na íntima arterial, formando as células espumosas. Estas células liberam lipídeos e colesterol, formando placas fibrolipídicas. A homocisteína tiolactona é também liberada das células espumosas e facilita a conversão dos tioretinaco ozonide das mitocôndrias em tiocos, resultando na hiperplasia e fibrose das células musculares lisas. A conseqüente produção aumentada de radicais de oxigênio causa dano intimal, oxida tioretinamida para sulfato de glicosaminoglicanas, ativa elastase, incita a trombogênese e aumenta o depósito de cálcio, formando a característica patológica da placa aterosclerótica. Outra questão importante referente aos efeitos da homocisteína no metabolismo oxidativo foi levantada, investigando derivados antineoplásticos sintéticos da homocisteína-tiolactona. Os resultados desses estudos levaram a uma nova teoria da participação dos derivados sintéticos, tioretinamida, tioretinaco e tioco, na fosforilação oxidativa e no controle do crescimento celular (MC CULLY, 1993; Mc CULLY, 1994). Sabe-se há longo tempo que distúrbios no metabolismo oxidativo estão associados à aterogênese, e estudos ultra-estruturais em animais envolvem a mitocôndria como um sítio primário para a indução da

aterogênese pela homocisteína (MC CULLY, 1996). Anormalidades mitocondriais similares são observadas no fígado em todos os tipos de homocistinúria humana. Esses estudos reforçam a visão teórica de que distúrbios na fosforilação oxidativa, catalisados pelo tioretinaco-ozonide, são causados por ação da homocisteína na função mitocondrial (MC CULLY, 1993; MC CULLY, 1994). A perda presumida de sítios ativos para o metabolismo oxidativo pela conversão do tioretinaco em tioco, pela homocisteína-tiolactona, é responsável não somente pelo acúmulo de radicais de oxigênio intracelulares e seus muitos efeitos na função celular, mas também explica a síntese aumentada de triglicerídeos e colesterol, que é característica da aterogênese. O colestano-triol, um oxiesterol altamente aterogênico, tem efeitos sobre a ultra-estrutura mitocondrial, que são idênticos aos da homocisteína (SELHUB, J. 1999).

Estudos em populações aparentemente normais mostram correlação inversa significativa entre a ingestão de folato na dieta e homocisteína plasmática (SELHUB et al., 1993). Tanto a deficiência de folato como de vitamina B₁₂ são comuns, particularmente em indivíduos idosos e estão associados à homocisteína plasmática elevada (JOOSTEN et al., 1993). Uma revisão feita por SAUBERLICK (1995), com base em inquéritos nutricionais nos Estados Unidos, concluiu o seguinte: enquanto a deficiência de folato, em níveis indutores de anemia ocorre em menos de 10% da população, a redução suficiente para causar níveis elevados de homocisteína pode ser muito comum. A elevação dos níveis da homocisteína plasmática, devido à deficiência de vitamina B₆, parece menos comum, mas tem sido relatada (SELHUB et al., 1993; JOOSTEN et al., 1993; BOERS, 2000).

Os alimentos ricos em vitaminas B₆, B₁₂ e folatos, que previnem a elevação da homocisteína plasmática, perdem no seu preparo, quer pela cocção prolongada ou pelo uso de microondas, estas vitaminas, prevalecendo na alimentação gorduras e hidratos de carbono que não possuem nenhuma vitamina. O aumento no número de pessoas com deficiência de vitamina B₆, B₁₂ e folatos, que resulta em hiperhomocisteinemia, estão associados ao decréscimo da ingestão destas vitaminas. (SELHUB et al., 1993). O conhecido declínio da concentração destas vitaminas em pessoas idosas deve-se à diminuição do consumo e sua deficiente absorção. Há também nas pessoas idosas diminuição de coenzimas, que fariam absorção das

vitaminas pela membrana celular e do tioretinaco-ozonide das mitocôndrias elevando a homocisteína plasmática (MC CULLY, 1993).

A interação de dieta e predisposição genética foi considerada desde os primeiros estudos mostrando que as raças orientais são susceptíveis a aterogênese quando se valem de dietas ocidentais. Achados recentes mostram que os negros africanos são mais resistentes a hiper-homocisteinemia comparados aos brancos, usando a mesma dieta (UBBINK et al., 1995).

As mutações na enzima 5,10- metilenotetraidrofolato-redutase causavam complicações clínicas de ateromas e morte prematura (MUDD et al., 1972). Recentemente tem sido demonstrado haver uma variante, muito comum, que codifica uma forma instável desta enzima. A prevalência de homozigose (+/+), heterozigose (+/-) ou normalidade (-/-) para esta enzima tem sido relatada em diferentes populações, respectivamente nas seguintes porcentagens: franco canadenses 12%, 51%, 37% (FROSST et al., 1995); irlandeses 6%, 43%, 51% (WHITE HEAD et al., 1995); alemães 5%, 42%, 53%, (VAN DER PUTT et al., 1995); italianos 16% (DE FRANCHIS et al., 1995) e nos norte-americanos 5%, 33%, 62% (OU CY et al., 1995). Portanto, na maioria das comunidades, de 5 a 16% terão duas cópias do gene anormal, enquanto freqüentemente metade da população total terá pelo menos uma cópia.

Estudos prévios demonstram que esta variante genética é caracterizada por uma forma termolábil da enzima nos linfócitos e pensa-se que ela está associada à hiperhomocistenemia moderada (KANG et al., 1991). Em estudo com 207 pacientes, VAN DER PUTT et al. (1995) encontraram diferença estatisticamente significativa na homocisteína plasmática em 10 indivíduos homozigotos comparados a 86 heterozigotos e 111 indivíduos normais. KANG et al. (1993) mostram que a forma termolábil desta enzima era fator de risco para doença cardiovascular.

JACQUES et al. (1996) observaram que nos homozigotos para a variante a homocisteína somente era elevada em indivíduos cujos níveis de folato séricos estavam abaixo do valor médio. Naqueles com nível de folato séricos mais altos, os níveis de homocisteína não variam significativamente entre os 3 genótipos. Isto sugeriria que ter duas cópias anormais deste gene (homozigoto) elevaria a homocisteína plasmática e o risco para doença cardiovascular somente naqueles pacientes com níveis de folato baixo.

A importante questão de como a homocisteína, aminoácido que contém enxofre, afeta os processos bioquímicos das células e tecidos das paredes arteriais para produzir placas ateroscleróticas, é ainda hoje um campo ativo de investigação. Estudos iniciais com culturas celulares, obtidas de crianças com homocistinúria, descobriram uma nova via bioquímica, pela qual o átomo de enxofre da homocisteína-tiolactona é oxidado e convertido em fosfoadenosina-fosfosulfato, a coenzima que forma as glicosaminoglicanas sulfatadas das placas ateroscleróticas (MC CULLY e RAGSDALE, 1970). Outros experimentos com culturas de células de músculo liso e do endotélio envolveram a homocisteína na formação de peróxido de hidrogênio e no controle do crescimento celular, por seus efeitos sobre o fator de crescimento semelhante à insulina (CLOPATH et al., 1976), fator de crescimento derivado das plaquetas e formação de ciclina, levando a degeneração endotelial e hiperplasia das células musculares lisas das placas ateroscleróticas (MC CULLY, 1996).

Em animais hiper-homocisteinêmicos, a ativação da elastase da célula aórtica explica a degeneração característica da elastina em placas ateroscleróticas (MC CULLY, 1996). Dos vários estudos publicados na literatura e citados neste nosso estudo, pode-se concluir que a associação de pequenas elevações de homocisteína plasmática à doença cardiovascular é um fenômeno freqüente, e não apenas um raro erro inato do metabolismo da homocisteína. Este fato pode ser devido principalmente a duas situações: (1) as enzimas que metabolizam a homocisteína são dependentes, para a sua atividade, de três nutrientes: folato, vitamina B12 e vitamina B6, os quais podem estar deficientes, assim propiciando elevações dos níveis de homocisteína; (2) as enzimas são também foco de variantes genéticas anormais, que se têm se mostrado muito comuns nas populações estudadas.

Há também correlação entre homocisteinemia e hormônios femininos, pois mulheres na pré menopausa apresentam níveis de homocisteína 20% menor que os homens, e na menopausa há uma nítida elevação nos níveis de homocisteína. Este fato é objeto de investigação; mesmo em reposição hormonal em mulheres na menopausa não houve redução significativa dos níveis de homocisteína plasmática (BERGER, P. B. et al., 2000) (HAK et al., 2000). Pacientes com nefropatia apresentam elevação na homocisteína, sugerindo que os rins controlam a homocisteína sangüínea por mecanismo ainda desconhecido. Pacientes diabéticos

também apresentam homocisteína elevada em consequência da insuficiência renal (CHIARELL et al., 2000); BRATTSTROM e WILCKEN, 2000). Nas pessoas que fumam, a nicotina antagoniza o piridoxal-fosfato e eleva a homocisteína plasmática explicando-se seu papel no risco elevado nas doenças cardiovasculares (NYGARD et al., 1995).

Estudos revelam que dieta rica em frutas e verduras e suplementação de vitaminas B6, B12 e folatos nas dosagens de 10, 0,1 e 1mg/dia respectivamente diminuem a homocisteína circulante (UBBINK et al., 1993).

Recentemente *US Food and Drug Administration* aprovou a adição de folato nos pães nos Estados Unidos, esperando baixar o risco de doença vascular na população mais susceptível (MC CULLY, 1996).

Num estudo prospectivo no qual se procurou relacionar os níveis plasmáticos de homocisteína e a progressão dos sintomas da doença arterial periférica, TAYLOR (1999) concluiu que a hiper-homocisteinemia está associada à mortalidade pós coronariopatias, doenças cerebrovasculares e à progressão da doença oclusiva arterial dos membros inferiores. Numerosos estudos mostraram que os níveis de homocisteína plasmática são inversos aos níveis de folato, vitamina B₆ e vitamina B₁₂. (JACOB et al., 1994; Brattstrom, 1996 e OLSZEWSKI et al., 1989). Não se emprega vitaminoterapia para o tratamento de arterioesclerose doença, pois há diferença entre associação e causa e nem todas as associações e causas podem ser modificadas com terapia.

Estudos experimentais têm demonstrado o efeito de certas substâncias químicas no desenvolvimento da arterioesclerose, como o de STEINER em 1938, que demonstrou os efeitos da colina que protege a aorta de coelhos da arterioesclerose; e o de HARTROFT em 1952, demonstrando alterações arterioescleróticas nas artérias aorta, carótidas e coronárias em ratos com dieta deficiente em colina. Em 1995, ROLLAND et al. já observaram em suínos, com dieta rica em metionina, concentrações elevadas de homocisteína plasmática e lesões na lâmina elástica das artérias destes animais. Recentemente CHEN (2000), por meio de modelo de perfusão com homocisteína em carótidas de suínos, demonstrou os efeitos mitogênicos e citotóxicos da homocisteína nestas artérias após angioplastia. No trabalho de STEAD (2000), ele verificou que, colocando metionina em contato com hepatócitos de ratos, estas células transportavam mais homocisteína, sugerindo

que o fígado é o responsável pela regulação dos níveis plasmáticos da homocisteína. Em ratos o efeito da homocisteína elevada no plasma, diminui a vasodilatação e contribui para inativar o óxido nítrico no endotélio, como foi demonstrado por EBERHARDT (2000). No experimento de LENTZ (2000), em macacos com deficiência da enzima cistationina- β -sintetase e dieta pobre em folato, a hiper-homocisteinemia alterou a função endotelial.

O trabalho de SOUTHERN (1998) é o primeiro a relacionar endarterectomia carotidiana e hiper-homocisteinemia em ratos. Os ratos eram mantidos com dieta rica em homocisteína e verificou-se hiperplasia intimal pós endarterectomia carotidiana. Administrando a coelhos dieta com 2% de colesterol e noutro grupo a mesma dieta mas com ausência de vitamina B₆ e injetando-se homocisteína subcutânea, Mc CULLY (1970) demonstrou lesões arterioescleróticas mais intensas no grupo no qual foi injetado homocisteína.

Como pode ser observado, os trabalhos experimentais utilizam a homocisteína na forma de dieta ou injetável ou ainda nos modelos de perfusão, onde ela age diretamente nas células endoteliais.

A homocisteína, quando aplicada diretamente na célula endotelial, é altamente citotóxica (CHEN, 2000).

No presente estudo procurou-se evidenciar os efeitos aterogênicos da homocisteína na forma mais natural possível, com dieta rica em metionina, que faz parte da nossa alimentação; ela é demetilada no fígado e se transforma em homocisteína e pode ser dosada no plasma: objetivou-se demonstrar a não relação na aterogênese produzida pela hiper-homocisteinemia com o processo arterioesclerótico relacionado à hiperlipidemia, com depósito de colesterol e cálcio na parede arterial.

Não foram ainda estabelecidos níveis normais de homocisteína plasmática para animais de experimentação (SOUTHERN, 1998); entre estes incluem-se coelhos nos quais foi realizado este estudo. Os animais do grupo M e do grupo C receberam a mesma dieta sólida, incluindo vitaminas B₆ e B₁₂ (anexo I). Considerou-se como normal a média dos níveis plasmáticos da homocisteína do grupo controle, para serem comparados aos níveis plasmáticos da homocisteína do grupo M. No grupo controle não houve alteração nos níveis de homocisteína nas 8 semanas do experimento; os animais apresentavam valores médios de 3,67 $\mu\text{mol/l}$ para o dia 0,

3,65 $\mu\text{mol/l}$ no 30º dia e 3,70 $\mu\text{mol/l}$ no 60º dia. No grupo M houve aumento dos níveis séricos da homocisteína, partindo de 3,65 $\mu\text{mol/l}$ no dia 0 para o valor médio de 11,0 $\mu\text{mol/l}$ no 30º dia; 16,19 $\mu\text{mol/l}$ como valor médio no 60º dia. (tabela 6, gráfico 5). No grupo M, a homocisteína sérica atingiu níveis aproximadamente 5 vezes maiores que o grupo controle no período de 60 dias. Nos dois grupos os níveis de triglicerídios, colesterol, HDL e LDL não sofreram alterações significativas, mostrando que não tiveram influência nos resultados (tabelas 2, 3, 4 e 5).

No exame histológico da artéria aorta do grupo controle predomina camada íntima delgada sem depósitos subendoteliais, lâmina elástica interna bem definida, ausência de células inflamatórias (figuras 3, 4, 5 e 6). No grupo M os cortes histológicos mostram depósitos subendoteliais de macrófagos espumosos, fazendo protusão na luz do vaso, sem sinais da presença de cálcio, diferentemente de lesões arteriais, produzidas por dislipidemia ou a ela relacionadas, confirmando aterogênese produzida pela hiper-homocisteinemia. (figuras 7, 8, 9 e 10).

Comparou-se experimentalmente que a homocisteína elevada predispõe à aterogênese. É factível pressupor que, modificando-se este fator em seres humanos, poderemos beneficiar os pacientes, diminuindo os sintomas da arterioesclerose ou a sua progressão. Existem fatores que não podem ser modificados, como sexo masculino e diabetes; há outros que podem ser modificados, como a dieta alimentar e o hábito de fumar; ou mediante medicamentos, que podem ter efeitos colaterais indesejados, como os usados no controle da hipertensão arterial e os redutores dos lipídios plasmáticos. A homocisteinemia pode ser controlada somente com a administração de folato e dieta de frutas e vegetais, que facilmente se conseguem.

6 CONCLUSÃO

Concluiu-se que a homocisteína plasmática elevada produz aterogênese na aorta de coelhos.

REFERÊNCIAS

ALPHTAN, G.; PEKKANEN, J.; JAUHIANEN, M.; PITKANIEMI, J.; KARVONEN, M.; TUOMILEHTO, J.; SALONEN, J. T.; EHNHOLM, C. Relation of serum homocysteine and lipoprotein(a) concentrations to atherosclerotic disease in a prospective Finnish population based study. **Atherosclerosis**, v.106, p.9-19, 1994.

ANDREOTTI, F.; BURZOTTA, F.; MANZOLI, A.; ROBINSON, K. Homocysteine disease. **J. Thromb. Thrombolysis**, v.9, n.1, p.13-21, jan. 2000.

ANDREOTTI, F.; BURZOTTA, F.; MAZZA, A.; MANZOLI, A.; ROBINSON, K.; MAZERI, A. Homocysteine and arterial occlusive disease: a concise review. **Cardiological**, v.44, n.4, p.341-346, apr. 1999.

ARNESEN, E.; REFSUM, H.; BONAA, K. H.; UELAND, P. M.; FORDE, O. H.; NORDRETRAUG, J. E.; Serum total homocysteine and coronary heart disease. **Int. J. Epidemiol.**, v.24, n.4, p.704-709, 1995.

BEATTIE, D. K.; SIAN, M.; GREENHALGH, R.; DAVIES, A. H. Influence of systemic factors on pre-existing intimal hyperplasia and their effect on the outcome of infrainguinal arterial reconstruction with vein. **Br. J. Surg.**, v.86, n.11, p.1441-1448, nov. 1999.

BERGER, P.B.; HERRMANN, R.R.; DUMESIC, D.A. The effect of estrogen replacement therapy on total plasma homocysteine in healthy postmenopausal women. **Mayo Clin. Proc.**, v.75, n.1, p.188-23, jan. 2000.

BLACHER, J.; DUCIMETIERE, P.; SAFAR, M. Homocysteine and cardiovascular disease: What is the connection? **Presse Med.**, v.28, n.31, p.1717-1739, oct. 1999.

BOERS, G. H. J.; SMALS, A. G.; TRIJBELS, F. J.; LEERMAKERS, A. I.; KLOPPENBORG, P. W. Unique efficiency of methionine metabolism in premenopausal women may protect against vascular disease in the reproductive years. **J. Clin. Invest.**, v.72, p.1971-1976, dec. 1983.

BOERS, G.H.J.; SMALS, A.G.H.; TRIJBELS, F.J.M.; FOWLER, B.; BAKKEREN, J.A.J.M.; SCHOONDERWALDT, H.C.; KLEIJER, W.J.; KLOPPENBORG, P.W.C. Heterozygosity for homocystinuria in premature peripheral and cerebral occlusive arterial disease. **N. Engl. J. Med.**, v.13, n.12, p.709-715, Sept., 1985.

BOERS, G. H. J. Hyperhomocysteinemia as a risk factor for arterial and Venous disease. A review of evidence and relevance. **Thromb. Hemost.**, v.1, n.78. p.520-522, jul. 1997.

BOERS, G. H. J. Mild hyperhomocysteinemia is an independent risk factor of arterial vascular disease. **Senien. Thromb. Hemost.**, v.26, n.3, p.291-296, marc. 2000.

BOUSHEY, C. J.; BERESFORD, S. A. A.; OMENN, G. S.; MOTULSKY, A. G. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease: probable benefits of increasing folic acid intakes. **JAMA**, v.274, n.13, p.1049-1057, oct. 1995.

BRATTSTRÖM, L.E.; HARDEBO, J. E.; HULTBERG, B. L. Moderate homocysteinemia – a possible risk factor for arteriosclerotic cerebrovascular disease. **Stroke**, v.15, n.6, p.1012-1016, nov./dec. 1984.

BRATTSTRÖM, L.E.; ISRAELSON, B.; LINDGARDE, F.; HULTBERG, B. L. Higher plasma homocysteine in vitamin B₁₂ deficiency than in heterozygosity for homocystinuria due to cystathionine- β -synthetase deficiency. **Metabolism**, v.37, p.175-178, 1988.

BRATTSTRÖM, L.E. Vitamins as homocysteinemia – lowering agents. **J. Nutr.**, v.126, p.1265-1280, 1996.

BRATTSTRÖM, L.; WILCKEN, D.E. Homocysteine and vascular disease: cause or effect? **Am. J. Clin.Nutr.**, v.72, n.2, p.315-323, aug. 2000.

CARSON, N. A. J. & NEILL, D. W. Metabolic abnormalities detected in a survey of mentally backward individuals in Northern Ireland. **Arch. Dis. Child.**, v.37, p.505-513, 1962.

CHAO, C. L.; KUO, T.L.; LEE, Y. T. Effects of methionine reduced hyperhomocysteinemia on endothelium dependent vasodilation and oxidative status in healthy adults. **Circulation**, v.101, p.485-490, feb. 2000.

CHEN, C.; HALHOS, M. E.; SUROWIEC, S. M.; CONHLIN, B. S.; LIN, P. H. LUMSDEN, A.B. Effects of homocysteine on smooth cell proliferation cell culture and artery perfusion culture models. **J. Surg. Res.**, v.88, n.1, p.26-33. jan. 2000.

CHIARELLI, F.; POMILIO, M.; MOHN, A.; TUMINI, S.; VANELLI, M.; MORGESE, G.; SPAGNOLI, A.; VERROTTI, A. Homocysteine levels during fasting and after methionine loading in adolescents with diabetic retinopathy and nephropathy. **J. Pediatr.**, v.137, n.3, p.386-392, sep. 2000.

CHRISTEN, W. G.; AJANI, V. A.; GLYMI, R. J. HENNEBENS, C. H. Blood levels of homocysteine and increased risks of cardiovascular disease: causal or casual? **Arch. Intern. Med.**, v.4, n.160, p.422-456. Feb. 2000.

CHRISTENSEN, B.; REFSUM, H.; VINTERMYR, O.; UELAND, P. M. Homocysteine export from cells cultured in the presence of physiological or superfluous levels of methionine: methionine loading of nontransformed, transformed, proliferating, and quiescent cells in culture. **J. Cell. Physiol.**, v.146, p.52-62, 1991.

CIPOLLA, M. J.; WILLIAMPON, W. K.; MEHLES, M. L.; TAYLOR, L. M. JR.; POSTER, J. M. The effect of elevated homocysteine levels on adrenergic vasoconstriction of human resistance arteries: The role of the endothelium and reactive oxygen species. **J. Vasc. Surg.**, v.31, n.4, p.751-759, apr. 2000.

CLARKE, R.; DALY, L.; ROBINSON, K.; NAUGHTEN, E.; CAHALANE, S.; FOWLER B.; GRAHAM, I. Hyperhomocysteinemia: an independent risk factor for vascular disease. **N. Engl. J. Med.**, v.324, n.17, p.1149-1155, apr. 1991.

CLOPATH, P.; SMITH, V. C.; MC CULLY, K. S. Growth promotion by homocysteic acid. **Science**, v.192, p.372-374, 1976.

COULL, B. M.; MALINOW, M. R.; BEAMER, N.; SEXTON, G.; NORDT, F.; DE GARMO, P. Elevated plasma homocyst(e)ine concentration as a possible independent risk factor for stroke. **Stroke**, v.21, n.4, p.572-576, apr. 1990.

DE FRANCHIS, R.; SEBASTIO, G.; MANDATO, C.; ANDRIA, G.; MASTROLACOVO, P. Spina bifida 677T C mutations, and role of folate. **Lancet**, v.346, p.1703, 1995.

DEN HEIJER, M.; KOSTER, T.; BLOM, H.J. et al. Hyperhomocysteinemia as a risk factor for deep-vein thrombosis. **N. Engl. J. Med.**, v.334, p.759-762, 1996.

DENURTH, K.; ATGER, V.; BORDERIE, D.; BENOIT, M. O.; SAUVAGET, D.; LOTERSZTAJN, S.; MOOTTI, N. Homocysteine decreases endothelium production by cultured human endothelial cells. **Eur. J. Biochem.**, v.263, n.2, p.367-376, jul. 1999.

DI MINNO, G.; DAVI, G.; MARGAGLIONE, M.; CIRILLO, F.; GRANDONE, E.; CIABATTONI, G.; CATALANO, I.; STRISCIUGLIO, P.; ANDRIA, G.; PATRONO, C.; MANCINI, M. Abnormally high thromboxane biosynthesis in homozygous homocystinuria. Evidence for platelet involvement and probucolsensitive mechanism. **J. Clin. Invest.**, v.92, p.1400-1406, sept. 1993.

DONAHUE, S.; STURMAN, J. A.; GAULL, G. Arteriosclerosis due to homocyst(e)inemia: failure to reproduce the model in weanling rabbits. **Am. J. Pathol.**, v.77, n.2, p.167-174, nov., 1974.

DUDMAN, N. P. B. & WILCKEN, D. E. L. Increased plasma copper in patients with homocystinuria due to cystathionine- β -synthase deficiency. **Clin. Chim. Acta**, v.127, p.105-113, 1983.

DUDMAN, N. P. B.; HICKS, C.; LYNCH, J. F.; WILCKEN, D. E. L.; WANG, J. Homocysteine thiolactone disposal by human arterial endothelial cells and serum in vitro. **Arterioscler. Thromb.**, v.11, n.3, p.663-670, 1991.

DU VIGNEAUD, V.; RESSLER, C.; RACHELE, J. R. The biological synthesis of "labile methyl groups". **Science**, v.112, p.267-271, sept. 1950.

EBERHARDT, R.T.; FORGIONE, M.A.; CAP, A.; LEOPOLD, J.A.; RUDD, M.A.; TROLLET, M.; HEYDRICK, S.; STARK, R.; KLINGS, E.S.; MOLDOVAN, N.I.; YAGHOUBI, M.; GOLDSCHMIDT-CLERMONT, P.J.; FARBER, H.W.; COHEN, R.; LOSCALZO, J. Endothelial dysfunction in a murine model of mild hyperhomocyst(e) inemia. **J. Clin. Invest.**, v.106, n.4, p.483-491, aug. 2000.

ENGBERSEN, A. M. T.; FRANKEN, D. G.; BOERS, G. H. J.; STEVENS, E. M. B.; TRIJBELS, F. J. M.; BLOM, H. J. Thermolabile 5, 10 – methylenetetrahydrofolate reductase as a cause of mild hyperhomocysteinemia. **Am. J. Hum. Genet.**, v.56, p.142-150, 1995.

FINKELSTEIN, J. D. & MARTIN, J. J. Methionine metabolism in mammals: adaptation to methionine excess. **J. Biol. Chem.**, v.261, n.4, p.1582-1587, feb. 1986.

FINKELSTEIN, J. D. Methionine metabolism in mammals. **J. Nutr. Biochem.**, v.1, p.228-237, may 1990.

FODINGER, M.; HORL, W. H.; SUNDERPLASSMANN, G. Molecular biology of 5, 10 – methylenetetrahydrofolate reductase. **J. Mephral.**, v.13, n.1, p.20-33. jan/feb. 2000.

FOODY, J. M. Homocysteine and lipoprotein(a) interact to increase CAD risk in young men and women. **Arterioscler Thromb Vas. Biol.**, v.20, n.2, p.493-502, feb. 2000.

FOWKES, F. G. R. Epidemiology of atherosclerotic arterial disease in the lower limbs. **Eur. J. Vasc. Surg.**, v.2, p.238-291, 1988.

FOWLER, B. Disorders of homocysteine metabolism. **J. Inher. Metab. Dis.**, v.20, p.270-285, 1997.

FRANKEN, D.G.; BOERS, G.H.J.; BLOM, H.J.; TRIJBELS, F.J.M.; KLOPPENBORG, P.W.C. Treatment of mild hyperhomocysteinemia in vascular disease patients. **Arterioscler. Thromb.**, v.14, p.465-470, Mar., 1994.

FROSST, P.; BLOM, H. J.; MILOS, R.; GOYETTE, J.; SHEPPARD, C. A.; MATTHEWS, R. G.; BOERS, G. J. H.; DEN HEIZER, M.; KLUIGTURAUS, L. A. J.; VAN DER HERVEL, L. P.; ROSEN, R. A candidate genetic risk factor for cardiovascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. **Nature Genet.**, v.10, p.111-113, 1995.

FUSTER, V. & PEARSON, T. A. 27th Bethesda Conference: matching the intensity of risk factor management with the hazard for coronary disease events. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v.27, p.957-1047, 1996.

GAREBER, J. E.; SLOTT, J. H.; ULANE, R. E.; SCHULMAN, J. D.; STUART, M. J. Effect of homocysteine and homocystine on platelet and vascular arachidonic acid metabolism. **Pediatr. Res.**, v.16, p.490-493, 1982.

GEBARA, O. C. E.; WAJNGARTEN, M.; BARRETO, A. C. P. Novos fatores de risco da doença arterial coronária. **Rev. Soc. Cardiol. Estado de São Paulo**, v.7, n.3, p.340-347, maio/jun. 1997.

GENEST JR., J. J.; MC NAMARA, J. R.; UPSON, B. SALEM, D. N.; ORDOVAS, J. M.; SACHAEFER, E. J.; MALINOW, M. R. Prevalence of familial hyperhomocyst(e)inemia in men with premature coronary artery disease. **Arterioscler. Thromb.**, v.11, n.5, p.1129-1136, sept./oct. 1991.

GERHARD, G. T.; DUELL, P. B. Homocysteine and atherosclerosis. **Curr. Opin. Lipidol**, v.10, n.5, p.417-445, oct. 1999.

GERRISTEN, T.; VAUGHN, J. G.; WAISMAN, H. A. The identification of homocysteine in the urine. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.9, n.6, p.493-496, 1962.

GERRITSEN, T. & WAISMAN, H. A. Homocystinuria, an error in the metabolism of methionine. **Pediatrics**, v.33, p.413-420, mar. 1964.

GIANNINI, M. J.; COLEMAN, M.; INNERFIELD, I. Antithrombin activity in homocystinuria (letter). **Lancet.**, v.1, p.1094, may 1975.

GIBSON, J. B.; CARSON, N. A. J.; NEILL, D. W. Pathological findings in homocystinuria. **J. Clin. Pathol.**, v. 17, p.427-437, 1964.

GOYETTE, P.; SUMNER, J. S.; MILOS, R.; DUNCAN, A. M. V.; ROSENBLATT, D. S.; MATTHEWS, R. G.; ROZEN, R. Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA mapping and mutation identification. **Nature Genet.**, v.7, p.195-200, june 1994.

GOYETTE, P.; FROSST, P.; ROSENBLATT, D. S.; ROZEN, R. Seven novel mutations in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and genotype/phenotype correlations in severe methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. **Am. J. Hum. Genet.**, v.56, p.1052-1059, 1995.

GRAHAM, I. M.; DALY, L. E.; REFSUM, H. M. et al. Homocisteína plasmática como fator de risco para doença cardiovascular. **JAMA Brasil**, v.2, p.158-164, 1988.

GRAHAM, I. M.; DALY, L. E.; REFSUM, H. M.; ROBINSON, K.; et al. Plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. The European Concerted Action Project. **JAMA**, v.277, n.22, p.1775-1781, june 1997.

HAJJAR, K. A. Homocysteine-induced modulation of tissue plasminogen activator binding to its endothelial cell membrane receptor. **J. Clin. Invest.**, v.91, p.2873-2879, june 1993.

HAK, A.E.; POLDERMAN, K.H.; WESTENDORP, I.C.; JAKOBS, C.; HOFMAN, A.; WI, J.C.; STEHOUWER, C.D. Increased plasma homocysteine after menopause. **Atherosclerosis**, v.1, n.149, p.163-168, mar. 2000.

HARKER, L. A.; SLICHTER, S. J.; SCOTT, C. R.; ROSS, R. Homocysteinemia. Vascular injury and arterial thrombosis. **N. Engl. J. Med.**, v.291, n.11, p.537-543, sept. 1974.

HARKER, L. A.; ROSS, R.; SLICHTER, S. J.; SCOTT, C. R. Homocysteine-induced arteriosclerosis. The role of endothelial cell injury and platelet response in its genesis. **J. Clin. Invest.**, v.58, p.731-741, sept. 1976.

HARKER, L. A.; HARLAN, J. M.; ROSS, R. Effect of sulfinpyrazone on homocysteine-induced endothelial injury and arteriosclerosis in baboons. **Circ. Res.**, v.53, n.6, p.731-739, dec. 1983.

HARTROFT, W.S.; RIDOUT, J.H.; SELLER, E.A.; BEST, C.H. Atheromateous changes in aorta, carotid and coronary arteries of choline deficient rats. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v.81, p.384-393, 1952.

HAYASHI, T.; HONDA, G.; SUZUKI, K. Na atherogenic stimulus homocysteine inhibits cofactor activity of thrombomodulin and enhances thrombomodulin expression in human umbilical vein endothelial cells. **Blood**, v.79, n.11, p.2930-2936, june 1992.

HILDEN, M.; BRANDT, N. J.; NILSSON, I. M.; SCHÖNHEYDER, F. Investigations of coagulation and fibrinolysis in homocystinuria. **Acta Med. Scand.**, v.195, p.533-535, 1974.

HILL-ZOBEL, R. L.; PYERITZ, R. E.; SCHEFFEL, U.; MALPICA, O.; ENGIN, S.; CAMARGO, E. E.; ABBOTT, M.; GUILARTE, T. R.; HILL, J.; MC, INTYRE, P. A.; MURPHY, E. A.; TSAN, M. F. Kinetics and distribution of ¹¹¹ indium labelled platelets in patients with homocystinuria. **N. Engl. J. Med.**, v.307, n.13, p.781-786, 1982.

IRVINE, C.; WILSON, Y. G.; CURRIE, I. C. et al. Hyperhomocysteinemia is a risk factor for Vena graft stenosis. **Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.**, v.12 p.304-309, 1996.

ISRAELSSON, B.; BRATTATRÖM, L. E.; HUTELBERG, B. L. Homocysteine and myocardial infarction. **Atherosclerosis**, v.71, p.227-233, 1988.

JACOB, R.A.; WU, M.M.; HENNING, S.M.; SWENDSEID, M.E. Homocysteine increases as folate decreases in plasma of healthy men during short-term dietary folate and methyl group restriction. **J. Nutr.**, v.124, p.1072-1080, 1994.

JACOBSEN, D. W.; GATAUTIS, V. J.; GREEN, R.; ROBINSON, K.; SAVON, S. R.; SECIC, M.; J. I, J.; OTTO, J. M.; TAYLOR JR., L. M. Rapid HPLC determination of total homocysteine and other thiols in serum and plasma: Sex differences and correlation with cobalamin and folate concentrations in healthy subjects. **Clin. Chem.**, v.40, n.6, p.873-881, 1994.

JACQUES, P.F.; BOSTOM, A.G.; WILLIAMS, R.R.; ELLISON, R.C.; ECKFELDT, J.H.; ROSENBERG, I.H.; SELHUB, J.; ROSEN, R. Relationship between folate status, a common mutation in methylene-tetrahydrofolate reductase and plasma homocysteine concentrations. **Circulation**, v.93, p.7-9, 1996.

JONES, B.G.; ROSE, F.A.; TUDBALL, N. Lipid peroxidation and homocysteine induced toxicity. **Atherosclerosis**, v.105, p.165-170, 1994.

JOOSTEN, E.; VAN DER BERG, A.; RIEZLER, R. Metabolic evidence that deficiencies of vitamin B12 (cobalamin), folate, and vitamin B6 occur commonly in elderly people. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.58, p.468-476, 1993.

KANG, S. S.; WONG, P. W. K.; BOCK, H. G.; HORWITZ, A.; CRIX, A. Intermediate hyperhomocysteinemia resulting from compound heterozygosity of methylenetetrahydrofolate reductase mutations. **Am. J. Hum. Genet.**, v.48, p.546-551, 1991.

KANG, S. S.; WONG, P. W. K.; SUSMANO, A.; SORA, J.; NORUSIS, M.; RUGGIE, N. Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase: an inherited risk factor for coronary artery disease. **Am. J. Hum. Genet.**, v.48, p.536-545, 1991.

KANG, S. S.; PASSEN, E. L.; RUGGIE, N.; WONG, P. W. K.; SORA, H. Thermolabile defect of methylenetetrahydrofolate reductase in coronary artery disease. **Circulation**, v.88, n.4, (part 1), p.1463-1469, oct. 1993.

KANNEL, W. B. & SYTKOWSKI, P. A. Atherosclerosis risk factors. **Pharmac. Ther.**, v. 32, p.207-235, 1987.

KANWAR, Y. S.; MANALIGOD, J. R.; WONG, P. W. K. Morphologic Studies in a patient with homocystinuria due to 5, 10-methylenetetrahydro folate reductase deficiency. **Pediatr. Res.**, v.10, p.598-609, 1976.

KIRK ROGER, E. Experimental design procedures for the behavioral sciences. California: Brooks/Cole Publishing Company, 1982.

KOCH, H.G.; NABEL, P.; JUNKER, R.; AUBERGER, K.; SCHOBESS, R.; HOMBERGER LINNEBANK, M.; NOWAK-GOTTL, U. The 677T genotype of the common MTHFR thermolabile and fasting homocysteine in childhood venous thrombosis. **Eur. J. Pediatr.**, v.158, n.3, p.113-116, 1999.

KRISHNASWAMY, K. & RAO, S. B. Failure to produce atherosclerosis in *Macaca radiata* on a high-methionine, high-fat, pyridoxine-deficient diet. **Atherosclerosis**, v.27, p.253-258, 1977.

LING, W.; HAJJAR K. A. Inhibition of endothelial cell thromboresistance by homocysteine. **J. Nutr.**, v.130 (25 Suppl); p.373s-376s. feb. 2000.

LENTZ, S. R. & SADLER, J. E. Inhibition of thrombomodulin surface expression and protein C activation by the thrombogenic agent homocysteine. **J. Clin. Invest.**, v.88, p.1906-1914, dec. 1991.

LENTZ, S. R. & SADLER, J. E. Homocysteine inhibits von Willebrand factor processing and secretion by preventing transport from the endoplasmic reticulum. **Blood**, v. 81, n.3, p.683-689, feb. 1993.

LENTZ, S.R.; ERGER, R.A.; DAYAL, S.; MAEDA, N.; MALINOW, M.R., HEISTAD, D.D. Folate dependence of hyperhomocysteinemia and vascular dysfunction in cystathionine beta-synthase-deficient mice. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v.279, n.3, p. 970-975, 2000.

LEVY, D. & KANNEL, W. B. Cardiovascular risks: new insights from Framingham. **Am. Heart J.**, v. 116, p.266-272, 1988.

LOTUFO, P.A. Epidemiologia das doenças cardíacas no Brasil: Histórico, situação atual e proposta de modelo teórico. **Rev. Soc. Cardiol. Estado de São Paulo**, v.6, n.5, p.541-547, set./out., 1996.

MALINOW, M. R.; KANG, S. S.; TAYLOR, L. M.; WONG, P. W. K.; COULL, B.; INAHARA, T.; MUKERJEE, D.; SEXTON, G.; UPSON, B. Prevalence of hyperhomocyst(e)inemia in patients with peripheral arterial occlusive disease. **Circulation**, v.79, n.6, p.1180-1188, june, 1989.

MALINOW, M. R.; AXTHELM, M. K.; MEREDITH, M. J.; MAC DONALD, N. A.; UPSON, B. M. Synthesis and transsulfuration of homocysteine in blood. **J. Lab. Med.**, v.123, n.3, p.421-429, mar., 1994.

MANSOOR, M. A.; SVARDAL, A. M.; UELAND, P. M. Determination of the *in vivo* redox status of cysteine, cysteinylglycine, homocysteine, and glutathione in human plasma. **Anal. Biochem.**, v.200, p.218-229, 1992.

MATTHIAS, D.; BECKER, C.H.; RIEZLER, R.; KINDLING, P.H. Homocysteine induced arteriosclerosis-like alterations of the aorta in normotensive and hypertensive rats following application of high doses of methionine. **Atherosclerosis**, (in the press). 2001.

MAYER, E. L.; JACOBSEN, D. W.; ROBINSON, K. Homocysteine and coronary atherosclerosis. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v.27, n.3, p.517-527, mar., 1996.

MC CULLY. Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. **Am. J. Pathol.**, v.56, n.1, p.111-128, july, 1969.

MC CULLY, K. S. & RAGSDALE, B. D. Production of arteriosclerosis by homocysteinemia. **Am. J. Pathol.**, v. 61, n.1, p.1-11, oct., 1970.

MC CULLY. Homocysteine theory of arteriosclerosis: development and current status. **Atheroscler. Rev.**, p.157-246, 1983.

MC CULLY, K. S. & WILSON, R. B. Homocysteine theory of arteriosclerosis. **Atherosclerosis**, v.22, p.215-227, 1995.

MC CULLY, K. S. Homocysteine and vascular disease. **Nature Medicine**, v.2, n.4, p.386-389, apr., 1996.

MC DONALD, L.; BRAY, C.; FIELD, C.; LOVE, F.; DAVIES, B. Homocystinuria, thrombosis, and the lipo-lipid platelets. **Lancet**, p.745-746, apr., 1964.

MC DOWELL, I. F.; LANG, D. Homocysteine and endothelial dysfunction: a link with cardiovascular disease. **J. Nutr.**, v.130 (25 Suppl.) p.3695-3725, feb., 2000.

MUDD, S. H.; FINEHLSTEIN, J. D.; IRREVERRE, F.; VASTER, L. Homocystinuria: an enzymatic defect. **Science**, v.143, p.1443-1445, 1964.

MUDD, S. H.; LEVY, H. L.; SKOVBY, F. Disorders of transsulfuration. In: SCRIVER, C. R.; BEAUDET, A. L.; SLY, W. S.; VALLE, D. (eds.) **The metabolic and molecular bases of inherited disease**. New York: Mc Graw-Hill, p.693-734, 1989.

MUDD, S. H.; UHLENDORF, B. W.; FREEMAN, J. M.; FINKELSTEIN, J. D.; SHIH, V. E. Homocystinuria associated with decreased methylenetetrahydrofolate reductase activity. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.46, n.2, p.905-912, 1972.

NARUSZEWICZ, M.; MIKIEWICZ, E.; OLSZEWSKI, A. J.; MC CULLEY, K.S. Thiolation of low-density lipoprotein by homocysteine thiolactone causes increase aggregation and altered interaction with cultured macrophages. **Nutr. Metal. Cardiovasc. Dis.**, v.4, p.70-77, 1994.

NEHLER, M.R.; TAYLOR JR., L.M. Homocysteinemia as a risk factor for atherosclerosis: a review. **Cardiovasc Surg.**, v.5, p.559-567, 1997.

NILSSON, J.; REGNSTRO, J.; FROSTEGARD, J.; STIKO, A. Lipid oxidation and atherosclerosis. **Herz**, v.17, p.263-269, 1992.

NISHINAGA, M.; OZAWA, T.; SHIMADA, K. Homocysteine, a thrombogenic agent, suppresses anticoagulant heparin sulfate expression in cultured porcine aortic endothelial cells. **J. Clin. Invest.**, v.92, p.1381-1386, 1993.

NYGARD, O. et al. Total plasma homocysteine and cardiovascular risk profile. **JAMA**, v.274, p.1526-1533, 1995.

NYGARD, O.; NORDREHAUG, J.E.; REFSUM, H.; UELAND, P.M.; FARSTAD, M.; VOLLSET, S.E. Plasma homocysteine levels and mortality in patients with coronary artery disease. **N. Engl. J. Med.**, v.337, p.230-236, 1997.

NYGARD, O.; VOLLSET, S. E.; REFSUM, H.; BRATTSTROM, L.; UELAND, P. M. Total homocysteine and cardiovascular disease. **J. Intern. Med.**, v.246, n.5, p.425-454, nov., 1999.

OLSZEWSKI, A.J.; SZOSTAK, W.B.; BIALKOWSKA, M.; et al Reduction of plasma lipid and homocysteinemia levels by pyridoxine folate, choline, riboflavin, and troxerutin in atherosclerosis. **Atherosclerosis**, v.75, p.1-6, 1989.

OSTER, O.; DAHM, M.; OELERT, H.; PRELLWITZ, W. Concentrations of some trace elements (Se, Zn, Cu, Fe, Mg, K) in blood and heart tissue of patients with coronary heart disease. **Clin. Chem.**, v.35, n.5, p.851-856, 1989.

OU CY, ; STEVENSON, R.F.; BROWN, V.K. V677T homozygosity associated with thermolabile 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for neural tube defects. **Am. J. Hum. Genet.**, v.57, p.233^a, 1995.

PALARETI, G. & COCCHERI, S. Lowered antithrombin III activity and other clotting changes in homocystinuria: effects of a pyridoxine-folate regimen. **Haemostasis**, v.19 (suppl. 1), p.24-28, 1989.

PANCHARUNITI, N.; LEWIS, C.A.; SAUBERLICH, H.E.; PERKINS, L.L.; GO, R.C.P.; ALVAREZ, J.O.; MACALUSO, M.; ACTON, R.T.; COPELAND, R.B.; COUSINS, A.L.; GORE, T.B.; CORNWELL, P.E.; ROSEMAN, J.M. Plasma homocist(e)ine, folate, and vitamin B-12 Concentrations and risk for early-onset coronary artery disease. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.59, p.940-948, 1994.

PANGANAMALA, R.V.; KARPEN, C.W.; MEROLA, A.J. Peroxide mediated effects of homocysteine on arterial prostacyclin synthesis. **Prostaglandins Med.**, v.22, p.349-356, 1986.

RABELO, L.M.; COTRIM, F.L.S.; NOVAZZI, J.P.; MARTINEZ, T.L.R. Fibrinogênio e aterosclerose. In: MARTINEZ, T.L.R. & LOURENÇO, D.M. (eds.) **Avaliação e conduta nos riscos tromboaterogênicos**. São Paulo: Art Plus, 1996, p.31-43.

REDDY, G. S. R. & WILCKEN, D. E. L. Experimental homocysteinemia in pigs: comparison with studies in sixteen homocystinuric patients. **Metabolism**, v.31, n.8, p.778-783. Aug., 1982.

REFSUM, H.; HELLAND, S.; UELAND, P. M. Radioenzymic determination of homocysteine in plasma and urine. **Clin. Chem.**, v.31, n.4, p.642-628, 1985.

REFSUM, H.; CHRISTENSEN, B.; DJURHUUS, R.; UELAND, P.M. Interaction between methotrexate, "rescue" agents and cell proliferation as modulators of homocysteine export from cells in culture. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.258, n.2, p.559-566, 1991.

RENIHART, J.F. & GREENBERG, L.D. Arteriosclerotic lesions in pyridoxine-deficient monkeys. **Am. J. Pathol.**, v.25, p.481-491, 1949.

ROBINSON, K.; MAYER, E.L.; MILLER, D.P.; GREEN, R.; VAN LENTE, F.; GUPTA, A.; KOTTKE-MARCHANT, K.; SAVON, S.R.; SELHUB, J.; NISSEN, S.E.; KUTNER, M.; TOPOL, E.J.; JACOBSEN, D.W. Hyperhomocysteinemia and low pyridoxal

phosphate: common and independent reversible risk factors for coronary artery disease. **Circulation**, v.92, n.4, p.2825-2830, Feb., 1995.

ROBINSON, K. Homocysteine and coronary artery disease. In: **Risk factor update: focus on homocysteine, the new paradigm**. Orlando: The Cleveland Clinic Foundation, p.53-57, 1996.

RODGERS, G.M. & CONN, M.T. Homocysteine, an atherogenic stimulus, reduces protein C activation by arterial and venous endothelial cells. **Blood**, v.75, n.4, p.895-901, Feb., 1990.

RODGERS, G.M. & KANE, W.H. Activation of endogenous factor V by a homocysteine-induced vascular endothelial cell activator. **J. Clin. Invest.**, v.77, p.1909-1916, June, 1996.

ROLLAND, P.H.; FRIGGI, A.; BARLATIER, A.; PIQUET, P.; LATRILLE, V.; FAYE, M.M.; GUILLOU, J.; CHARPIOT, P.; BODARD, H.; GHIRINGHELLI, O.; CALAF, R.; LUCCIONI, R.; GARÇON, D. Hyperhomocysteinemia-induced vascular damage in the minipig. Captopril – hydrochlorothiazide combination prevents elastic alterations. **Circulation**, v.91, n.4, p.1161-1174, feb., 1995.

ROSENBLATT, D. S. Inherited disorders of folate transport and metabolism In: SCRIVER, C. R.; BEAUTE, A. L.; SLY, W. S.; VALLE, D. (eds.) **The metabolic base of inherited disease**, 7th edition. New York: Mc Graw-Hill, p.3111-3128, 1995.

ROSENBLATT, D. S. Recent advances in Genetics: interactions between enzymes, homocysteine and B vitamins. In: **Risk factor update: focus on homocysteine, the new paradigm**. Orlando: The Cleveland Clinic Foundation, p.71-73, 1996.

ROSENBLATT, D. S. & ERBE, R. W. Methylenetetrahydrofolate reductase in cultured human cells II. Genetic and biochemical studies of methylenetetrahydrofolate reductase deficiency, **Pediatr. Res.**, p.1141-1143, 1997.

ROSS, H. The pathogenesis of atherosclerosis. In: BRAUNWALD, E. **Heart Disease – A Textbook of Cardiovascular Medicine**. Philadelphia. Saunders. 1997. P.1105-1125.

ROSS, R. & GLOMSET, J. A. The pathogenesis of atherosclerosis. **N. Engl. J. Med.**, v.420, p.295-396, 1976.

ROSS, R. The pathogenesis of atherosclerosis: A perspective for the 1990s. **Nature**, v.362, p.801-809, 1993.

SCHIMKE, R. N.; MC KUSICK, V. A.; HUANG, T.; POLLACK, A. D. Homocystinuria: studies of 20 families with 38 affected members. **JAMA**, V.193, N.9, P.711-719, 1965.

SELHUB, J.; JACQUES, P. F.; WILSON, P. W. F.; RUSH, D.; ROSENBERG, L. H. Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population. **JAMA**, v.270, p.2693-2698, n.22, 1993.

SMOLIN, L. A.; CRENSHAW, T. D.; KURTYCZ, D.; BENEVENGA, N. J. Homocyst(e)ine accumulation in pigs fed diets deficient in vitamin B6: relationship to atherosclerosis. **J. Nutr.**, v.113, p.2122-2133, 1983.

SOUTHERN, F.N.; CRUZ, N.; FINK, L.M.; COONEY, C.A.; BARONE, G.W.; EIDT, J.F.; MOURSI, M.M. Hyperhomocysteinemia increases intimal hyperplasia in a rat carotid endarterectomy model. **J.Vasc. Surg.**, v.28, n.5, nov. 1998.

SOUZA, A. M. Homocistemia e doença arterial coronária: Estudo em 195 pacientes submetidos a cinecoronariografia. Curitiba, 1997. 113 f. Dissertação (Doutorado em Clínica Médica) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

STAMLER, J. S.; OSBORNE, J. A.; JARAKI, O.; RABBANI, L. E.; MULLINS, M.; SINGEL, D.; LOSCALZO, J. Adverse vascular effects of homocysteine are modulated by endothelium-derived relaxing factor and related oxides of nitrogen. **J. Clin. Invest.**, v.91, p.308-318, jan.1993.

STAMPFER, M. J.; MALINOW, M. R.; WILLETT, W. C.; NEWCOMER L. M.; UPSON, B.; ULLMANN, D.; TISHLER, P. V.; HENNEKENS, C. H. A prospective study of plasma homocyst(e)ine and risk of myocardial infarction in US physicians. **JAMA**, V.268, N.7 P.877-881, 1992.

STARKEBAUM, G.; HARLAN, J. M. Endothelial cell injury due to coppercatalyzed hydrogen peroxide generation from homocysteine. **J. Clin. Invest.**, v.77, p.1370-1376, 1986.

STEAD, L.M.; BROSANAN, M.E.; BROSANAN, J.T. Characterization of homocysteine metabolism in the rat liver. **Biochem J.**, v.15, n.350, p.685-692, 2000.

STEINBERG, D.; PARTHASARATHY, S.; CAREW T. E.; KHOO, J. C.; WITZTUM, J. L. Beyond cholesterol: modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. **N. Engl. J. Med.**, v.320, n.14, p.915-924, 1989.

STEINBRECHER, U. P.; ZHANG, H.; LOUGHEED, M. Role of oxidatively modified LDL in atherosclerosis. **Free Radilcal Biol. Med.**, v.9, p.155-168, 1990.

STEINER, A. The effect of choline on the production of experimental atherosclerosis in rabbits. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v.38, p.231-233, 1938.

TAYLOR JR., L. M.; DE FRANG, R. D.; HARRIS., E. J.; PORTER, J. M. The association of elevated plasma homocyst(e)ine with progression of symptomatic peripheral arterial disease. **J. Vasc. Surg.**, v.13, p.128-136, jan., 1991.

TAYLOR JR., L. M.; MONETA, L. G.; SEXTON, G. J.; SCHUFF, R. A.; PORTER, J. M. Prospective blinded study of the relationship between plasma homocysteine and

progression of symptomatic peripheral arterial disease. **J. Vasc. Surg.**, v.29, p. 8-19, jan., 1999.

TEMPLE, M. E.; LUZIER, A. B.; KAZERAD, D. J. Homocysteine as a risk factor for atherosclerosis. **Ann. Pharmacother.**, v.34, n.1, p.57-65, jan., 2000.

TOKGOZOGLU, S. L.; ALIKAPIFOGLU, M.; ATALAR, E.; AYTEMIER, K.; OZER, N.; OVUNC, K.; USAL, O.; KES, S.; TUNCBILEK, E. Methylene tetra hydrofolate reductase genotype and the risk and extent of coronary artery disease in a population with low plasma folate. **Heart**, v.81, n.5, p.518-540, may, 1999.

TSAI, J. C.; PERRELLA, M. A.; YOSHIKUMI, M.; HSIEH, C. M.; HABER, E.; SCHLEGEL, R.; LEE, M. E. Promotion of vascular smooth muscle cell growth by homocysteine: a link to atherosclerosis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.91, p.6369-6373, july, 1994.

UBBINK, J.B.; VERMAAK, W.J.H.; BENNETT, J.M.; BECKER, P.J.; VAN STADEN, D.A.; BISSBORT, S. The prevalence of homocysteinemia and hypercholesterolemia in angiographically defined coronary heart disease. **Klin. Wochenschr.**, v.69, p.527-534, 1991.

UBBINK, J.B.; VANDERMERWE, A.; VERMAAK, W.J.H.; DELPORT, R. Homocysteinemia and the response to vitamin supplements. **Clin. Investig.**, v.71, p.993-998, 1993.

UBBINK, J.B.; VERMAAK, W.J.H.; VAN DER MERWE, A.; BECKER, P.J.; DELPORT, R.; POTGIETER, H.C. Vitamin requirements for the treatment of hyperhomocysteinemia in humans. **J. Nutr.**, v.124, p.1927-1933, 1994.

UBBINK, J.B. et al. Effective homocysteine metabolism may protect South African blacks against coronary heart disease. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.62, p.802-808, 1995.

UELAND, P.M.; REFSUM, H. Plasma homocysteine, a risk factor for vascular disease: plasma levels in health, disease and drug therapy. **J. Lab. Clin. Med.**, v.114, p.473-501, Nov., 1989.

UELAND, P.M.; REFSUM, H.; BRATTSTRÖM, L. Plasma homocysteine and cardiovascular disease. In: FRANCIS JR., R.B. (ed.) **Atherosclerotic cardiovascular disease, hemostasis, and endothelial function**. New York: Marcel Dekker, Inc., 1992. p.183-236.

UHLEMANN, E. R.; TENPAS, J. H.; LUCKY, A. W.; SCHULMAN, J. D.; MUDD, S. H.; SHULMAN, N. R. Platelet survival and morphology in homocystinuria due to cystathionine synthase deficiency. **N. Engl. J. Med.**, v.295, p.1283-1286, 1976.

VAN DER PUTT, N.M.J.; STEEGERS-THEUNLSEN, R.P.M.; FROSST, P.; TRIJBELS, J.M.; ESKES, T.K.; VAN DEN HEUVEL, L.P.; MUZIMAN, E.L.; DEN HEYER, M.; ROZEN, R.; BLOM, H. Mutated methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for spina bifida. **Lancet**, v.346, p.1070-1071, 1995.

VENTURA, P.; PANINI, R.; VERLATO, C.; SEARPETTA, G.; SALVIOLI, G. Peroxidation indices and total antioxidant capacity in plasma during hiperhomocysteinemia induced by methionine oral loading. **Metabolism.**, v.49, n.2, p.225-233, Feb., 2000.

VON ECKARDSTEIN, A.; MALINOW, M.R.; UPSON, B.; HEINRICH, J.; SCHULTE, H.; SCHÖNFELD, R.; KÖHLER, E.; ASSMANN, G. Effects of age, lipoproteins, and hemostatic parameters on the role of homocyst(e)inemia as a cardiovascular risk factor in men. **Arterioscler. Thromb.**, v.14, p.460-464, 1994.

WALL, R.T.; HARLAN, J.M.; HARKER, L.A.; STRIKER, G.E. Homocysteine-induced endothelial cell injury in vitro: A model for the study of vascular injury. **Thromb. Res.**, v.18, p.113-121, 1980.

WANG, J.; DUDMAN, N.P.B.; WILCKEN, D.E.L. Effects of homocysteine and related compounds on prostacyclin production by cultured human vascular endothelial cells. **Thromb. Haemostas.**, v.70, n.6, p.1047-1052, 1993.

WHITE, H.H.; ROWLAND, L.P.; ARAKI, S.; THOMPSON, H.L.; COWEN, D. Homocystinuria. **Arch. Neurol.**, v.13, p.455-470, 1965.

WHITEHEAD, A.S.; GALLAGHER, P.; MILLS, J.L.; KIRKE, P.N.; BURKE, H.; MOLLOY, A.M.; WEIR, D.G.; SHIELDS, D.C.; SCOTT, J.M. A genetic defect in 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase in neural tube defects. **Q. J. Med.**, v.88, p.763-766, 1995.

WILCKEN, D.E.L.; WILCKEN, B. The pathogenesis of coronary artery disease. A disponible role for methionine metabolism. **J. Clin. Invest.**, v.57, p.1079-1082, 1976.

WOO, K.S.; CHOOK, P. LOLIN, Y.T., CHEURIG, A.S.; SUN, Y.Y.; SANDERSON, J.E.; METRREWELI, C.; CEMERMAJER, D.S. Hyperhomocysteinemia is a risk factor for arterial endothelial dysfunction in humans. **Circulation**, v.21, n.96(8), p.2542-2546, Oct., 1997.

WOO, K.S. CHOOK, P.; LOLIN, Y.I.; SANDERSON, J.E.; METRELI, C.; CELEMAYER, D.S. Folic acid improves arterial endothelial function in adults with hyperhomocystinemia. **J. Ann. Coll. Cardiol.**, v.34, n.7, p.2002-2008, Dec., 1999.

WU, L.L.; WU, J.; HUNT, S.C.; JAMES, B.C.; VINCENT, G.M.; WILLIAMS, R.R.; HOPKINS, P.N. Plasma homocyst(e)ine as a risk factor for early familial coronary artery disease. **Clin. Chem.**, v.40, n.4, p.552-561, 1994.

WUILLEMIN, W.A.; SOLENTHALER, M. Hyperhomocysteinemia: a risk factor for arterial and venous thrombosis. **Vasa**, v.28, n.3, p.151-156, Aug., 1999.

ZITTOUN, J.; TONETTI, C.; BORIES, D.; PIGNORI, J.M.; TULLIEZ, M. Plasma homocysteine levels related to interactions between folate status and methylene-tetrahydrofolate reductase: a study in 52 healthy subjects. **Metabolism**, v.47, n.11, p.1413-1421, Nov., 1998.

ANEXO 1

RAÇÃO COELHOS DA NUTRIARA

Composição da ração: Nutriara para roedores.

Calcário calcítico, farelo de alfafa, farelo de trigo, feno de alfafa, fosfato bicálcio, milho integral moído, grão de aveia, cloreto de sódio, melaço, grão de soja extrusado, grão de sorgo, premix mineral, premix vitamínicos.

Níveis de garantia:

Unidade máxima	12,00%
Proteína bruta	15,00%
Extrato etéreo	1,2%
Matéria fibrosa	16,08%
Cálcio	2,00%
Fósforo	0,50%

Enriquecimento por kg do produto

Vitamina A	3.000UI	Vitamina B ²	3,00 mg	Cobalto	1,00 mg
Vitamina D	5.000UI	Vitamina B ₆	1,00 mg	Zinco	60,00 mg
Vitamina E	5,00 mg	Vitamina B ₁₂	10,00 mg	Manganês	43,00 mg
Vitamina K ₃	1,00 mg	Ferro	40,00 mg	Iodo	0,32 mg
Vitamina B ₁	2,00 mg	Cobre	6,00 mg	Selênio	8,00 mg
Pantotenato de cálcio			9,80 mg		
Niciara			15,00 mg		

ANEXO 2

BANCO DE DADOS – GRUPO C

DIA C1	PESO	HDL	LDL	COLESTEROL mg/dl	TRIGLICERÍDIOS mg/dl	HOMOCISTEÍNA μmol/l
0	1.956	10,0	74,0	80,0	80,8	3,8
30	2.000	10,0	73,0	79,0	85,0	3,8
60	2.000	11,0	74,0	80,0	87,0	3,8
DIA C2	PESO	HDL	LDL	COLESTEROL mg/dl	TRIGLICERÍDIOS mg/dl	HOMOCISTEÍNA μmol/l
0	2.010	10,0	74,0	75,0	59,0	4,0
30	2.015	11,0	76,0	75,0	59,0	4,0
60	2.020	12,0	78,0	81,0	60,0	4,0
DIA C3	PESO	HDL	LDL	COLESTEROL mg/dl	TRIGLICERÍDIOS mg/dl	HOMOCISTEÍNA μmol/l
0	2.350	12,0	78,0	80,0	65,0	4,2
30	2.350	12,0	77,0	80,0	66,0	4,1
60	2.370	12,0	78,0	81,0	67	4,2
DIA C4	PESO	HDL	LDL	COLESTEROL mg/dl	TRIGLICERÍDIOS mg/dl	HOMOCISTEÍNA μmol/l
0	2.450	12,0	76,0	81,0	65,0	3,1
30	2.453	12,0	76,0	80,0	65,0	3,0
60	2.456	12,0	77,0	81,0	66,0	3,2
DIA C5	PESO	HDL	LDL	COLESTEROL mg/dl	TRIGLICERÍDIOS mg/dl	HOMOCISTEÍNA μmol/l
0	2.200	10,0	45,0	83,0	80,0	2,8
30	2.200	10,0	45,0	83,0	80,0	2,8
60	2.300	10,0	47,0	85,0	81,0	2,8
DIA C6	PESO	HDL	LDL	COLESTEROL mg/dl	TRIGLICERÍDIOS mg/dl	HOMOCISTEÍNA μmol/l
0	2.450	15,0	71,0	88,0	85,0	3,5
30	2.450	15,0	70,0	82,0	84,0	3,5
60	2.500	15,0	71,0	80,0	86,0	3,7

DIA C7	PESO	HDL	LDL	COLESTEROL mg/dl	TRIGLICERÍDIOS mg/dl	HOMOCISTEÍNA μmol/l
0	2.350	14,1	50,0	77,0	103,0	3,8
30	2.350	14,0	50,0	77,0	103,0	3,8
60	2.400	15,0	56,0	78,0	105,0	3,8
DIA C8	PESO	HDL	LDL	COLESTEROL mg/dl	TRIGLICERÍDIOS mg/dl	HOMOCISTEÍNA μmol/l
0	2.250	16,0	75,0	88,0	105,0	4,0
30	2.260	16,0	75,0	85,0	103,0	4,0
60	2.300	18,0	78,0	80,0	106,0	4,0
DIA C9	PESO	HDL	LDL	COLESTEROL mg/dl	TRIGLICERÍDIOS mg/dl	HOMOCISTEÍNA μmol/l
0	2.150	15,0	70,0	76,0	98,0	3,9
30	2.150	15,0	70,0	76,0	98,0	3,9
60	2.200	16,0	71,0	77,0	100,0	3,9
DIA C10	PESO	HDL	LDL	COLESTEROL mg/dl	TRIGLICERÍDIOS mg/dl	HOMOCISTEÍNA μmol/l
0	2.389	10,12	101,0	88,0	106,0	3,6
30	2.380	10,12	101,0	88,0	106,0	3,6
60	2.400	11,25	102,0	88,0	107,0	3,6

GRUPO M

DIA M1	PESO	HDL	LDL	COLESTEROL mg/dl	TRIGLICERÍDIOS mg/dl	HOMOCISTEÍNA μmol/l
0	2.050	16,0	86,0	79,0	93,0	3,6
30	2.050	16,0	86,0	79,0	93,0	10,0
60	2.100	16,0	86,0	79,0	93,0	16,0
DIA M2	PESO	HDL	LDL	COLESTEROL mg/dl	TRIGLICERÍDIOS mg/dl	HOMOCISTEÍNA μmol/l
0	2.300	12,0	75,0	83,0	94,5	2,8
30	2.350	12,0	73,0	80,0	93,0	8,0
60	2.400	12,0	70,0	85,0	94,0	17,0
DIA M3	PESO	HDL	LDL	COLESTEROL mg/dl	TRIGLICERÍDIOS mg/dl	HOMOCISTEÍNA μmol/l
0	2.358	15,5	98,0	82,0	92,0	2,9
30	2.370	15,0	96,0	82,0	90,0	11,0
60	2.400	15,6	99,0	82,0	92,0	16,0
DIA M4	PESO	HDL	LDL	COLESTEROL mg/dl	TRIGLICERÍDIOS mg/dl	HOMOCISTEÍNA μmol/l
0	2.350	14,0	77,0	67,0	68,0	3,2
30	2.380	14,0	75,0	67,0	68,0	13,0
60	2.390	14,0	77,0	67,0	68,0	15,1
DIA M5	PESO	HDL	LDL	COLESTEROL mg/dl	TRIGLICERÍDIOS mg/dl	HOMOCISTEÍNA μmol/l
0	2.378	18,0	67,0	83,0	69,0	3,0
30	2.380	18,0	67,0	83,0	65,0	13,0
60	2.400	18,0	68,0	83,0	70,0	17,1

DIA M6	PESO	HDL	LDL	COLESTEROL mg/dl	TRIGLICERÍDIOS mg/dl	HOMOCISTEÍNA μmol/l
0	2.150	15,6	78,0	75,0	63,0	3,0
30	2.180	15,0	78,0	72,0	60,0	13,0
60	2.200	16,0	78,0	75,0	63,0	18,0
DIA M7	PESO	HDL	LDL	COLESTEROL mg/dl	TRIGLICERÍDIOS mg/dl	HOMOCISTEÍNA μmol/l
0	2.200	17,7	65,0	71,0	77,0	3,2
30	2.200	17,0	63,0	70,0	75,0	12,0
60	2.250	17,7	65,0	73,0	78,0	15,1
DIA M8	PESO	HDL	LDL	COLESTEROL mg/dl	TRIGLICERÍDIOS mg/dl	HOMOCISTEÍNA μmol/l
0	2.178	15,1	68,0	83,0	66,0	4,0
30	2.190	15,0	65,0	80,0	65,0	11,0
60	2.200	15,1	68,0	83,0	66,0	16,0
DIA M9	PESO	HDL	LDL	COLESTEROL mg/dl	TRIGLICERÍDIOS mg/dl	HOMOCISTEÍNA μmol/l
0	2.210	16,0	70,0	80,0	69,0	4,0
30	2.220	16,0	70,0	80,0	68,0	10,0
60	2.210	16,0	70,0	80,0	69,0	15,5
DIA M10	PESO	HDL	LDL	COLESTEROL mg/dl	TRIGLICERÍDIOS mg/dl	HOMOCISTEÍNA μmol/l
0	2.350	17,0	79,0	88,0	78,0	3,8
30	2.380	16,0	78,0	85,0	78,0	10,0
60	2.400	17,0	79,0	88,0	78,0	16,1